

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3° CYCLE)

DE SCIENCES BIOLOGIQUES (BIOLOGIE VÉGÉTALE)

PAR

Jean - Louis FIASSON

Les Caroténoïdes des Basidiomycètes Survol Chimiotaxinomique

Soutenue le 11 Juillet 1968, devant la Commission d'Examen.

MM. KUHNER

Président

BOLDIN

LEBRETON

}

Examineurs

Service de Phytochimie et Phytobiologie
Laboratoire de Mycologie associé au C. N. R. S.
Département de Biologie Végétale

LES CAROTENOÏDES

DES

BASIDIOMYCETES :

SURVOL CHIMIOTAXINOMIQUE.



Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET, AUMERAS.

Doyen

M. J. BRACONNIER

Assesseurs

MM. L. DAVID
J. BOIDIN

Professeurs

MM. H. LONGCHAMBON	Minéralogie
M. PRETTRE	Chimie industrielle
C. COURTY	Chimie-Physique
R. KUHNER	Botanique
G. MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
R. PARIS	Chimie minérale
J. JANIN	Physique générale
J. FLANDRIN	Géologie appliquée
R. BERNARD	Physique industrielle
V. NIGON	Zoologie expérimentale
H. GAUTHIER	Géologie
J. WAUTIER	Zoologie
J. CHOPIN	Chimie biologique
J. BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
J. CUEILLERON	Chimie
C. EYRAUD	Chimie minérale
A. SARAZIN	Physique nucléaire
J. BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
G. PERES	Physiologie
G. MESNARD	Electronique
R. GRANDMONTAGNE	Physique
A. BOUTILLIER	Minéralogie
J. LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
J. DREUX	Chimie organique
S. TEICHNER	Chimie industrielle
M. PAVANS de CECCATTY	Zoologie
J.C. MERLIN	Chimie analytique
M. DUFAY	Physique de l'Atmosphère
G. PHILBERT	Physique
R. COHEN-ADAD	Chimie
L. DAVID	Géologie
J. CHANEL	Psychophysiologie
G. MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique
J. DEPRAZ	Physique nucléaire
J. GAUTHIER	Chimie
F. GAUME	Physique
R. UZAN	Physique

MM. J.M. LEGAY	Biologie animale
A. LAFORGUE	Physique
J. GERMAIN	Chimie
M. CHENEVOY	Pétrographie
J. BIGAY	Astronomie
Mme M. ERICSON	Physique
G. DESCOTES	Chimie organique

Professeurs sans chaire

MM. R. FERON	Mathématiques
R. GINET	Zoologie
G. ASCH	Physique
P. MICHEL	Minéralogie
Mle M. MAITROT	Physique
P. GEVIN	Géologie
D. PONASSE	Mathématiques
J. D'INCAN	Physique C.S.U.
P. LEFEBVRE	Mathématiques
R. PERNET	Mathématiques
R. CHERY	Physique
R. BERGEON	Physique C.S.U.
Mle D. GAUTHERON	Chimie biologique
A. ERBEIA	Physique
Y. LEMOIGNE	Botanique
L. MARTEL	Mécanique
G. MICHEL	Biochimie
P. PICARD	Mathématiques
P. LEBRETON	Biologie végétale
J. TOUSSET	Chimie
E. COMBET	Mathématiques

Maîtres de Conférences

MM. G. DEMARCO	Géologie
J. DAVID	Biologie animale
R. SCHMITT	Physique
A. LAURENT	Chimie organique
A. ROT	Mathématiques
P. BETHOUX	Mathématiques
M. GUSAKOW	Physique
Mle G. THOMAS	Chimie minérale
H. BUCHWALTER	Mathématiques C.S.U.
J. BOUZON	Mathématiques C.S.U.
J. COSNIER	Psychophysiologie
Mle D. LAMOURE	Biologie végétale
M. PORTHAULT	Chimie C.S.U.
G. VALLET	Chimie macromoléculaire
Y. HAUGAZEAU	Mathématiques
R. ENAY	Géologie
P. BERTHET	Biologie végétale
J. BRUN	Biologie animale
J. DELMAU	Physique
E. EL BAZ	Physique - Electricité
R. FONTANGES	Physiologie
J. HUET	Chimie
P. REMOND	Mathématiques C.S.U.

MM. M. LALANNE	Mathématiques
B. LESPINASSE	Génie chimique
G. MONNIER	Chimie des Métaux
J.L. PETIT	Electrotechnique
P. PINARD	Physique de la matière
M. RICHARD	Electricité - Electrotechnique
R. RIVIERE	Cristallographie
J. ROBIN	Chimie industrielle
F. SALLES	Mécanique
L. SICARD	Mécanique
F. STOEBER	Microbiologie

PERSONNELS EXERCANT LEURS FONCTIONS AUX I.U.T. DE LYON ET
=====

DE SAINT-ETIENNE
=====

I.U.T. - LYON : Directeur : M. L. FEUVRAIS
Professeur

M. L. FEUVRAIS Physique

Maîtres de Conférences

MM. B. POUYET Photochimie
A. VILLE Biologie appliquée

Maître de Conférences associé

I.U.T. - SAINT-ETIENNE : Directeur M. J.C. MERLIN

Maîtres de Conférences

MM. M. DAILLER Physique
A. COTTON Physique

PERSONNELS EXERCANT LEURS FONCTIONS A L'ECOLE CENTRALE LYONNAISE
=====

Professeur sans chaire

M. J. MATHIEU Mécanique des Fluides

Maître de Conférences

Mle G. COMTE-BELLOT Mécanique des Fluides

Maître de Conférences associé

M. A. MOIROUX Mécanique appliquée.

MM. P. JANIN	Mathématiques
C. RUHLA	Physique
C. DUPUY	Physique
M. CHASTRETTE	Chimie
J. PARIS	Chimie
J. DAILLIE	Biologie animale
J.P. LARPENT	Biologie végétale
Mle M.J. WORBE	Physiologie
A. HOLLEY	Psychophysiologie
J.P. BURQ	Physique
A. ROUX	Biologie animale

Maître de Conférences adjoint

M. P. PIERRON	Chimie
---------------	--------

Conseiller administratif

M. J. BURNET	
--------------	--

Secrétaire principal honoraire

M. A. ROUX	
------------	--

PERSONNELS EXERCANT LEURS FONCTIONS A L'I.N.S.A. de LYON

Directeur : M. M. BONVALET

Professeurs

MM. R. GELIN	Chimie organique
R. ARNAL	Electronique
M. PEYRON	Chimie-Physique
L. EYRAUD	Electricité - Electrotechnique
P. LAVIOLETTE	Biologie animale
H. PACHECO	Chimie biologique
E. PERNOUX	Optique
M. ROLIN	Thermodynamique chimique
	Physique de la matière

Professeurs sans chaire

MM. R. GOUTTE	Electricité - Electrotechnique
J. BOUSQUET	Chimie minérale
C. GUILLAUD	Electricité - Electrotechnique

Maître de Conférences

MM. M. CHEVRETON	Chimie
B. CLAUDEL	Chimie
L. CRONENBERGER	Chimie biologique
C. DUC-MAUGE	Chimie
P. GOBIN	Métallurgie
M. GODET	Mécanique
J. GOLE	Chimie macromoléculaire
C. GUITTARD	Physique
J. JOUBERT	Mécanique
J. LAFON	Mathématiques

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e CYCLE)

DE SCIENCES BIOLOGIQUES (BIOLOGIE VÉGÉTALE)

PAR

Jean - Louis FIASSON

Les Caroténoïdes des Basidiomycètes Survol Chimiotaxinomique

Soutenue le 11 Juillet 1968, devant la Commission d'Examen.

MM. KUHNER

Président

BOLDIN
LEBRETON

} Examinateurs

Service de Phytochimie et Phytophysologie
Laboratoire de Mycologie associé au C. N. R. S.
Département de Biologie Végétale

THESE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

LE DOCTEUR EN DOCTEUR DE RECHERCHE EN SCIENCES

DE SCIENCES BIOMEDICALES (BIOLOGIE VEGETALE)

Jean-Louis VASSON

Les Collections des Biologistes

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Université de Lyon

Faculté des Sciences

Biologie Végétale

https://archive.org/details/IA41552628_0011

AVANT - PROPOS

=====

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, il m'est un très agréable devoir d'exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui en ont permis la réalisation.

Je dois à Monsieur le Professeur R. KÜHNER et à Monsieur le Professeur J. BOIDIN mon orientation dans la voie de la Recherche scientifique : leur Enseignement de Physiologie végétale et de Biochimie en a éveillé le goût en moi, goût qu'ils ont comblé en voulant bien m'accueillir dans leur Laboratoire. Aussi est-ce pour moi un grand honneur et un grand plaisir de les voir aujourd'hui former mon Jury de thèse ; qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon attachement à Monsieur le Professeur Ph. LEBRETON, qui m'a réservé un accueil bienveillant dans son Service et n'a cessé de me prodiguer ses précieux conseils et ses encouragements.

Que Monsieur le Docteur H. THOMMEN (Ets. HOFFMAN-LA ROCHE, Bâle) et Monsieur le Docteur K. EGGER, Privat-Dozent à l'Institut de Botanique de l'Université d'Heidelberg, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour les stages fructueux qu'ils m'ont si aimablement permis d'effectuer dans leurs Laboratoires.

Je remercie très vivement Monsieur N. ARPIN, qui fut pour moi un fraternel Mentor dans le domaine des caroténoïdes, et Mademoiselle M.P. BOUCHEZ qui m'a souvent apporté son amicale et précieuse collaboration. Je n'oublie pas non plus tous mes camarades du Service de Phytochimie et Phytophysologie, dont la chaude sympathie a tant facilité ces recherches, et je les remercie pour le réel privilège que représente pour moi d'appartenir à un tel ensemble.

Enfin, que tous les membres du Département de Biologie végétale, dont l'obligeance et la compétence ont aidé à ce travail, soient ici remerciés.

	Page
CHAP. I. <u>LES CAROTENOIDES DES CHAMPIGNONS : GENERALITES.</u>	1
1. <u>STRUCTURE ET SEQUENCES BIOSYNTHETIQUES DES CAROTENOIDES.</u>	3
2. <u>REPARTITION DES CAROTENOIDES CHEZ LES CHAMPIGNONS.</u>	5
3. <u>CONSEQUENCES CHIMIQUES, TAXINOMIQUES ET PHYLOGENETIQUES.</u>	7
 CHAP. II. <u>MATERIEL ET TECHNIQUES.</u>	 15
1. <u>MATERIEL BIOLOGIQUE.</u>	15
2. <u>DETERMINATION DES PIGMENTS</u>	16
2.1. <u>Relations entre structure chimique et propriétés physiques.</u>	16
2.1.1. <u>Relations entre partage et structure.</u>	16
2.1.2. <u>Relations entre adsorption et structure.</u>	18
2.1.3. <u>Relations entre absorption U.V.-visible et structure.</u>	19
2.2. <u>Processus analytique.</u>	26
 CHAP. III. <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX.</u>	 37
1. <u>LEVURES ANASCOSPOREES.</u>	37
2. <u>HETEROBASIDIOMYCETES.</u>	40
2.1. <u>Ustilaginales.</u>	40
2.2. <u>Auriculariales.</u>	41
2.3. <u>Trémellales.</u>	42
2.4. <u>Calocérales.</u>	42
3. <u>GASTEROMYCETES.</u>	44
3.1. <u>Lycoperdacees.</u>	44
3.2. <u>Phallacées.</u>	44
4. <u>HYMENOMYCETES.</u>	44
4.1. <u>Hydnés.</u>	44
4.2. <u>Certiciés.</u>	45
4.3. <u>Clavaires.</u>	49
4.4. <u>Cantharellacées.</u>	52
4.5. <u>Agaricales.</u>	55

	page
CHAP. IV. <u>DISCUSSION DES RESULTATS.</u>	61
1. <u>RELATIONS ENTRE LEVURES CAROTENOGENES ET HETEROBASIDIES.</u>	61
2. <u>TAXINOMIE DES HYMENOMYCETES.</u>	63
2.1. <u>Remarques générales.</u>	63
2.2. <u>Genre Peniophora.</u>	64
2.3. <u>Champignons clavarioides.</u>	64
2.4. <u>Agaricales.</u>	66
2.5. <u>Champignons cantharelloides.</u>	67
3. <u>CONCLUSIONS.</u>	70
<u>RESUME.</u>	73
<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	75

CHAPITRE I

LES CAROTENOIDES DES CHAMPIGNONS : GENERALITES

De tous temps, la gamme extraordinairement riche et variée des teintes que présentent les Champignons a suscité bien des vocations mycologiques et a été largement mise à profit par le Systématicien pour définir les espèces comme pour les rassembler. De tels regroupements, opérés sur la base d'une même coloration, impliquent pour celle-ci une même origine, et supposent qu'un même composé chimique est en cause ; par là, la classification friesienne des Agaricales, basée sur la couleur de la sporée, était déjà chimiotauxinomique.

L'élucidation, au cours de la dernière décennie, des mécanismes des synthèses biologiques et de la réalisation des caractères héréditaires permet de confirmer cette inférence intuitive : la présence d'un pigment - comme de tout autre composé chimique - n'est que la manifestation visible de la possession d'un certain système enzymatique, c'est-à-dire au départ, d'une certaine "information nucléoprotéique". En effet, nous sommes en présence d'un enchaînement causal : ADN - ARN messager - protéine (notamment enzyme) - produit ou substrat chimique. L'analyse de la pigmentation n'est donc qu'une nouvelle manière "d'appréhender le génôme par l'intermédiaire du phénomène", plus surprenante à première vue mais tout aussi classique dans son fondement, et sans doute plus directe, que les critères systématiques traditionnels.

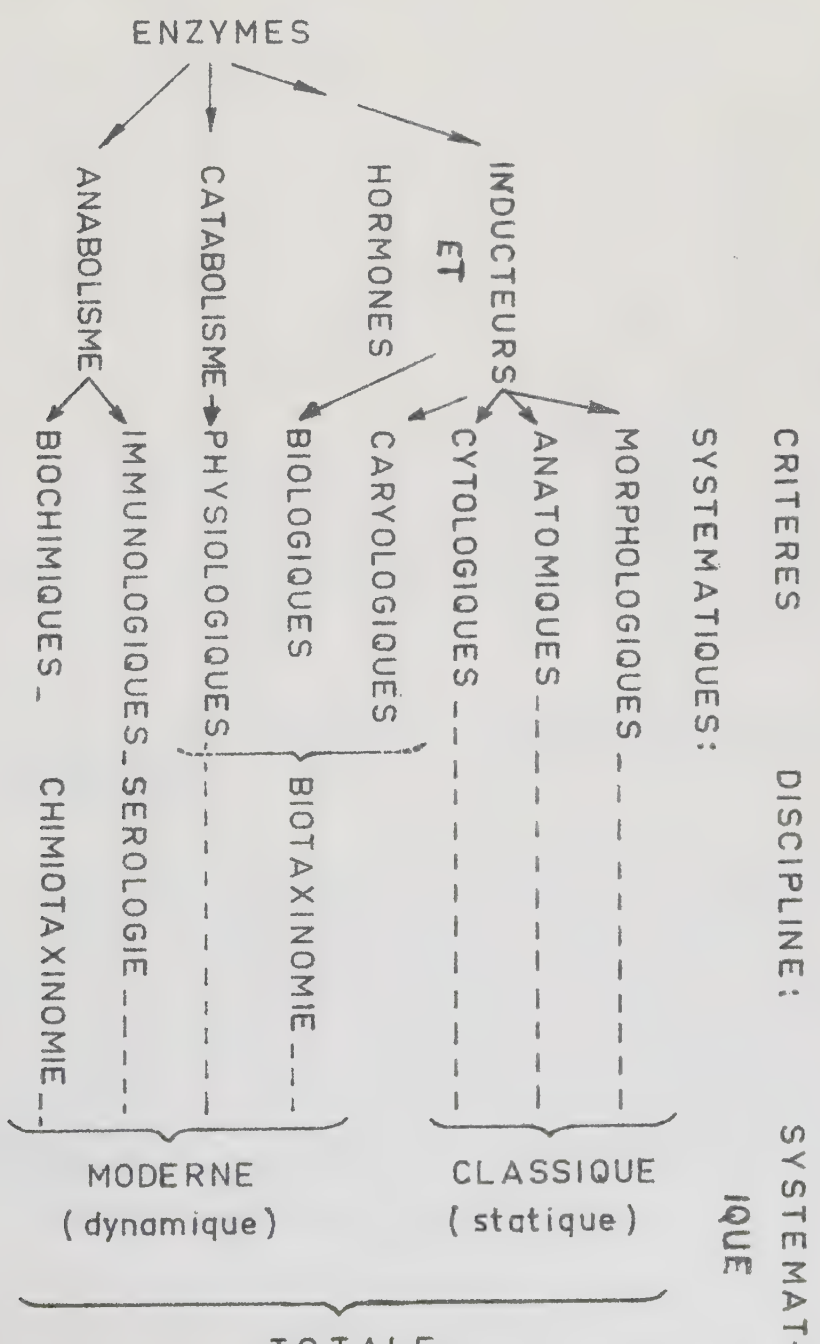
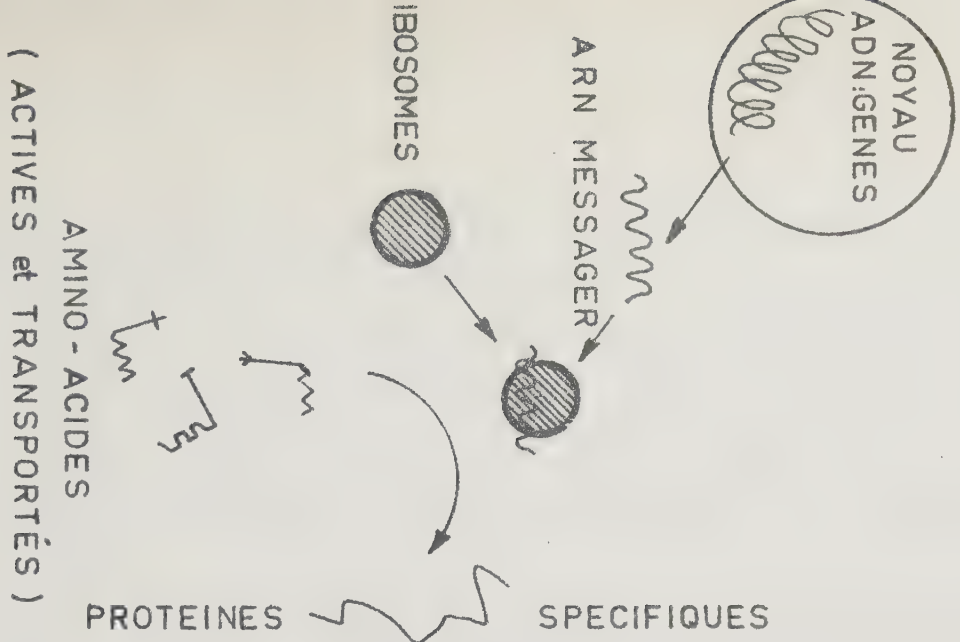
De même que les divers fossiles présents dans un niveau stratigraphique ne sont pas d'égal intérêt pour le Géologue, les différents composés que synthétise un être vivant ont une valeur très variable aux yeux du Taxinomiste. La possession d'une certaine molécule ou famille biogénétique est généralement d'autant plus significative, ou intéresse des taxons d'autant plus délimités, qu'elle est moins fréquente, ce qui exclut évidemment au premier chef les éléments des chaînes métaboliques essentielles à la vie : glucose et ATP, par exemple, rencontrés chez

tous les êtres vivants. Parallèlement, la position d'une famille biochimique sur une voie plus ou moins importante pour l'économie de l'organisme ne lui laissera qu'une latitude de variation plus ou moins étroite d'un groupe systématique à un autre, ainsi éventuellement caractérisés. Les produits de l'activité biosynthétique peuvent ainsi être grossièrement classés en molécules :

- de fonction, constituant le support métabolique de la matière vivante ;
- de réserve, aboutissements particuliers de l'anabolisme mais aussi points de départ différés du catabolisme énergétique (amidon et divers polysides analogues) ;
- de structure (cellulose, chitine, lignine ...) accumulées "sans espoir de retour" ;
- de déchet, d'excrétion, qui, une fois élaborées, semblent dépourvues de tout rôle ; les pigments caroténoïdes, chez les organismes hétérotrophes tout au moins, entrent dans cette dernière catégorie.

Au long de cette classification, le passage se fait des molécules les plus "actives" aux plus "inertes", des plus universelles aux plus spécifiques, les plus riches donc de signification taxinomique. Et de la sorte, si du fait même de leur évidence pour l'observateur, les pigments ont été parmi les premiers composés plus ou moins implicitement étudiés de ce point de vue, ce choix s'est montré, en particulier pour le groupe végétal qui nous intéresse, rationnellement justifié.

Mais la couleur, caractère macroscopique et anthropomorphique, est un élément bien fragile. Comme toute donnée morphologique, elle peut être l'objet de phénomènes de convergence : deux colorations extrêmement proches, voire même identiques, peuvent être le fait de deux pigments totalement différents qui, loin de traduire une parenté, indiquent au contraire une divergence dans l'orientation du chimisme. Cependant, ici, la valeur des ressemblances superficielles est facilement mesurée par le spectrophotomètre : ainsi Clitocybe venustissima et Hygrophoropsis aurantiaca présentent des couleurs orangées très proches qui pourraient a priori appuyer un



rapprochement de ces deux espèces ; mais si la coloration de la première est caroténoïdique, la matière colorante de la seconde est toute différente (5) . Cependant, avant même que les techniques physico-chimiques d'analyse aient pénétré dans les laboratoires de Mycologie, les caractères de solubilité, la localisation cytologique des pigments, en relation directe avec leur structure, avaient déjà fourni de précieuses indications dont les Systématiciens avaient su tirer le plus grand profit (98) .

PASTAC (123) a publié une revue des divers pigments des champignons envisagés sous l'angle chimique (quinones, notamment anthraquinones ; colorants polyéniques (dont les caroténoïdes), hétérocycliques...), cependant que HEIM (83) s'est attaché à mettre en valeur leur rôle en Systématique. Si les caroténoïdes fongiques sont négligés dans l'ouvrage de HEGNAUER (77) , ils ont fait l'objet, considérés de différents points de vue, de mises au point de GOODWIN (60) , HAXO (76) , et plus récemment VALADON (153) . Après avoir présenté les caroténoïdes dans leurs structures et leurs relations biogénétiques, nous dresserons le tableau de ce qui est actuellement connu de leur répartition chez les champignons. Ceci nous permettra de mettre en évidence les caractéristiques, les particularités de cette caroténogénèse, puis le parti que le Systématicien peut en tirer et quelles conclusions phylogéniques peuvent, dans certains cas, en être déduites.

1. - STRUCTURE ET SEQUENCES BIOSYNTHETIQUES DES CAROTENOÏDES.

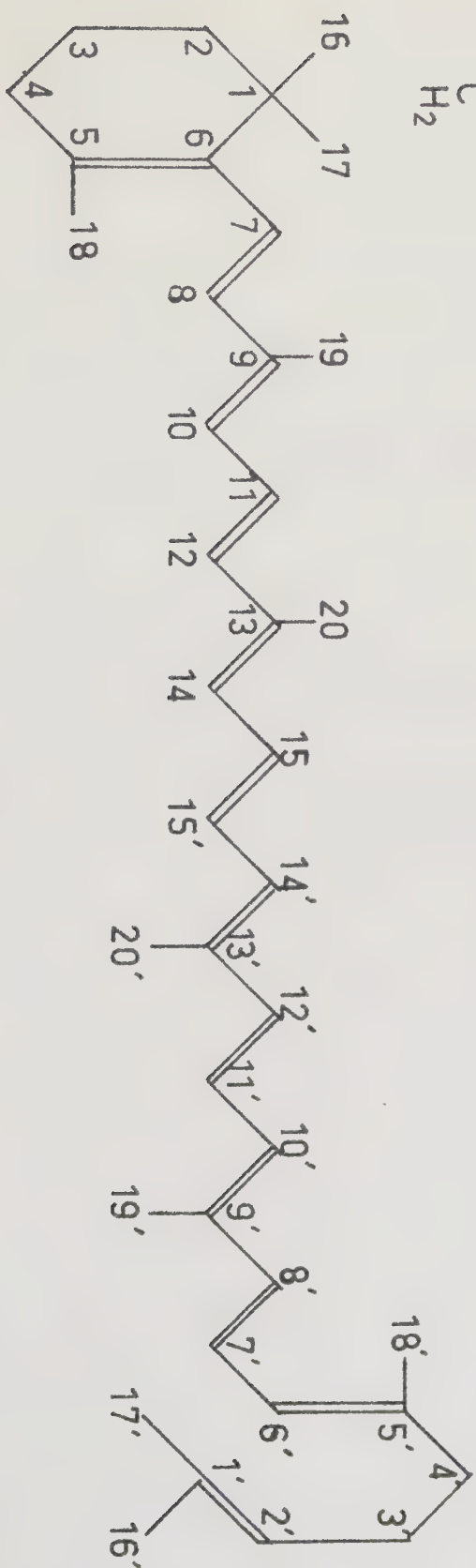
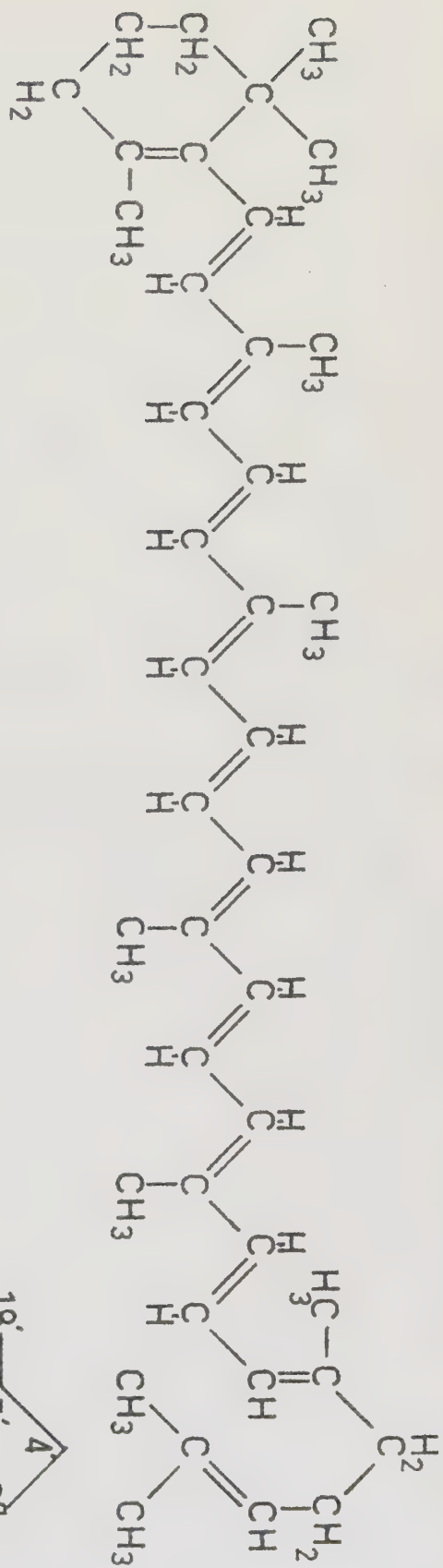
Les pigments liposolubles, insaponifiables, d'une couleur jaune, orangée ou rouge auxquels TSWETT attribua en 1911 le nom de caroténoïdes - les lipochromes des anciens auteurs - sont des composés à quarante atomes de carbone, portant un système de doubles liaisons conjuguées qui est à l'origine de leur coloration ; "sur le papier", tous peuvent être reliés par une série de réactions : cyclisation, déshydrogénation, hydrogénation, hydratation, oxygénation. L'un d'entre eux : le γ -carotène, illustrera pour nous leur structure.

Deux groupes de composés, bien que ne répondant pas exactement à cette définition, doivent y être rattachés. Il s'agit d'une part de produits incolores, car peu insaturés, le phytoène (I) et le phytofluène (II) ; d'autre part, des apo-caroténoïdes, qui possèdent moins de quarante carbones dans leur molécule et résultant de la dégradation ou de la scission oxydatives des caroténoïdes au sens strict ; la neurosporo-xanthine (XXVI) en est un exemple.

Les caroténoïdes peuvent, d'un point de vue essentiellement pratique, être divisés en carotènes, qui sont des hydrocarbures, et xanthophylles, dont la molécule renferme en outre de l'oxygène. Une autre classification sépare les caroténoïdes acycliques, monocycliques et bicycliques que représenteront pour nous respectivement le neurosporène (IV), le γ -carotène (XVI) et le β -carotène (XXVII) ; une telle distinction est plus naturelle car elle correspond, comme nous allons le voir, aux grandes directions dans lesquelles peut s'engager la biosynthèse de ces pigments, tandis que le passage des carotènes aux xanthophylles n'est qu'une étape identique franchie indépendamment sur des voies différentes.

Figuré ci-après, le schéma de la biosynthèse des caroténoïdes tel qu'il est aujourd'hui généralement admis (63, 108, 28) ou tel qu'il peut être postulé d'après la structure des pigments tout récemment étudiés (1, 43, 21, 9, 10, 51) nous montre que le squelette hydrocarboné subit d'abord une oxydation progressive par déshydrogénation. Au moins pour les pigments majeurs, ce n'est que lorsque cette désaturation est assez poussée (au niveau du neurosporène IV) que commencent à intervenir les deux grands processus de diversification de cette famille de pigments : la cyclisation terminale et l'oxygénation de la molécule. L'oxygène peut apparaître sous forme de groupement hydroxyle (alcool primaire : lycoxanthine⁽¹⁾) ; secondaire :

(1) - Contrairement à l'indication de la figure III et selon des résultats tout récents, la fonction alcool de la lycoxanthine n'est pas secondaire, sur le carbone 3 (Voir formule X) mais primaire, sur le carbone 16 (115) .



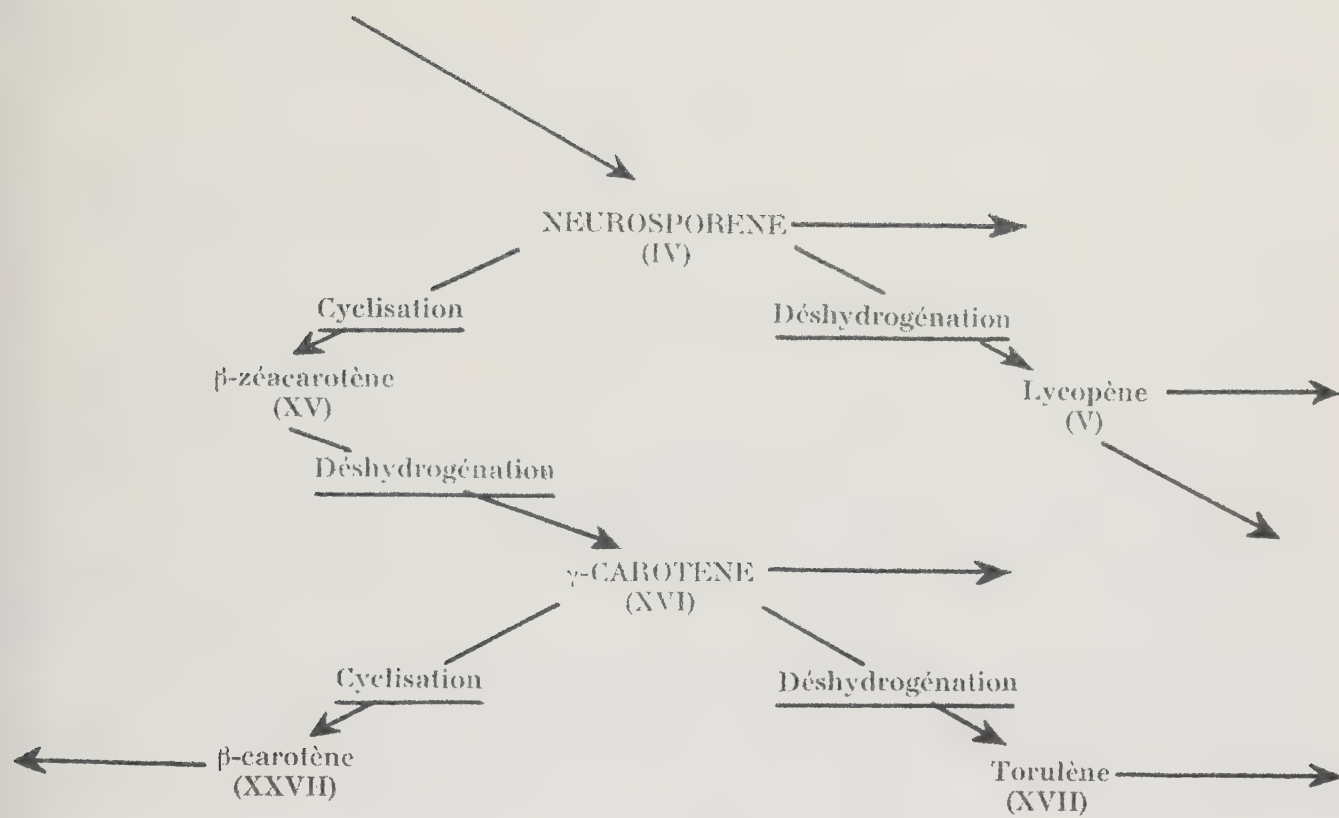
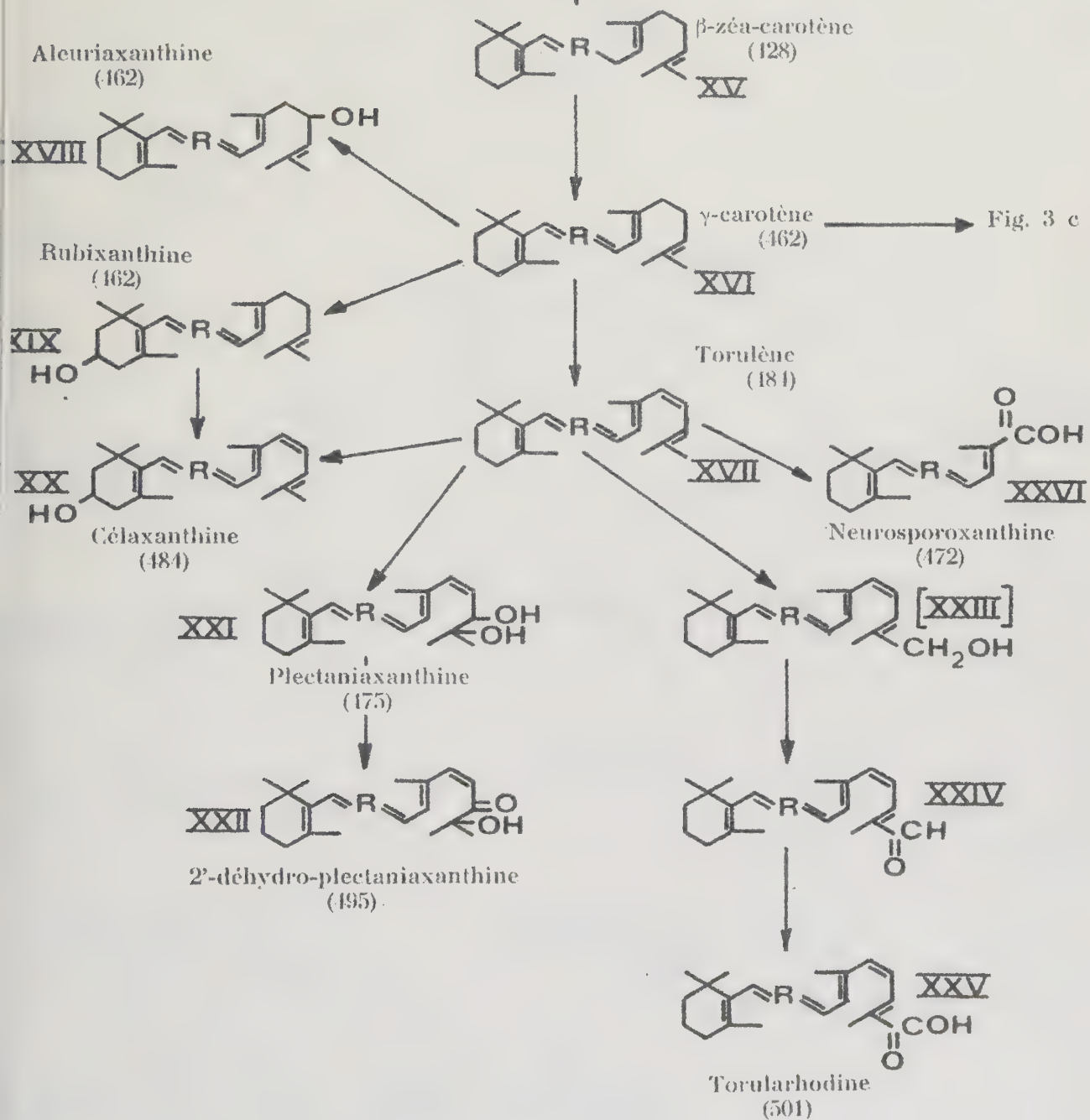


Fig. 2

(Cf. fig. 3 a)

Neurosporène IV
(410)

Cyclisation



CAROTENOÏDES MONOCYCLIQUES

Fig. 3 b

cryptoxanthine XXVIII ; tertiaire : chloroxanthine IX), carbonyle (aldéhyde : aldéhyde de la torularhodine XXIV ; cétone : échinénone XXXII) ou carboxyle (torularhodine XXV) ; les groupements méthoxyles des caroténoïdes de nombreuses Bactéries pourpres photosynthétiques (spirilloxanthine XII) et les époxydes si fréquents dans les xanthophylles des plantes vertes (violaxanthine XXX) semblent ici inconnus. Ajoutons que les xanthophylles des champignons peuvent exister sous forme libre ou estérifiée.

2. - REPARTITION DES CAROTENOÏDES CHEZ LES CHAMPIGNONS.

Les travaux effectués dans ce domaine, et dont les résultats sont récapitulés dans les tableaux ci-après, sont encore bien peu nombreux au regard de l'ampleur du problème, et beaucoup reste à faire avant que des conclusions générales et définitives puissent en être tirées. De plus de telles recherches sont fréquemment handicapées par le peu de matériel de départ disponible ; la teneur en pigments y est souvent faible, et leur extraction quantitative s'est révélée quelquefois difficile ; aussi est-il à penser que dans la plupart des analyses effectuées, surtout les plus anciennes, seuls les composés majeurs ont été reconnus. Toutefois, les techniques actuellement disponibles de chromatographie sur papier et sur couche mince, les réactions caractéristiques effectuées à l'échelle micro-chimique, le nombre toujours plus grand de composés de référence synthétisés par les chimistes organiciens, permettent l'identification ou même l'analyse structurale de pigments isolés en quantité minime (43, 9, 10) ; tout ceci autorise l'espoir d'un progrès intense de nos connaissances dans ce domaine.

La présence de caroténoïdes dans de nombreuses espèces de champignons est connue dans les travaux de BACHMANN (12), ZOPF (167), KOHL (95), et van WISSELINGH (163) ; dans de nombreux cas, l'étude structurale reste à faire. Tout aussi précieuses pour le Taxinomiste sont les listes dressées par ZOPF (167) et d'autres auteurs après lui (23, 119, 71) d'espèces ne produisant pas de caroténoïdes bien que

leur couleur ait souvent pu évoquer ces pigments. Il est à noter qu'à l'inverse la présence de caroténoïdes peut être masquée par celle, dominante, de composés développant une autre teinte, par exemple verte dans le cas de Leotia lubrica (167) . L'absence d'activité vitaminique A (66) ne permet pas de conclure à l'absence de caroténoïdes, beaucoup de ceux-ci (ne contenant pas de cycle " β " libre) étant inactifs de ce point de vue. Par contre leur localisation cytologique a permis de soupçonner la présence de caroténoïdes dans de nombreuses espèces (78-82, 84).

La recherche, à l'aide des méthodes modernes d'analyse, de caroténoïdes dans des champignons a été poursuivie ici et là depuis une trentaine d'années, soit quelquefois pour approfondir la connaissance d'une espèce prise isolément et en général brillamment colorée, soit dans un but physiologique, mais aussi parfois dans une optique taxinomique : citons les travaux de CANTINO et HYATT (25) , TURIAN (147) , VALADON (150, 152, 154).

Les résultats de ces différents travaux sont rassemblés dans les tableaux I à VI ; ceux-ci ne doivent pas faire illusion. D'une part, sur quelque 100.000 espèces de champignons décrites, une centaine seulement ont été étudiées de ce point de vue ; même si la majorité des champignons n'est pas caroténogène, on voit combien les données actuelles sont encore partielles. D'autre part, beaucoup d'analyses sont déjà anciennes, et mériteraient d'être reprises à l'aide de méthodes modernes ; des identifications même récentes se sont révélées erronées (10%) ; plusieurs espèces ont été l'objet d'analyses successives (Allomyces javanicus, Cantharellus tubaeformis, Sphaerobolus stellatus...) dont chacune a pu corriger ou compléter l'apport de la précédente, par suite de la véritable métamorphose qu'ont subie les techniques depuis une dizaine d'années. Enfin, comme nous l'avons dit, dans bien des cas la présence de caroténoïdes a été simplement notée, sans que leur identification ait été encore réalisée.

Nous n'avons pas mentionné ici l' α -carotène, signalé dans quelques rares espèces de champignons lors d'études généralement anciennes. Très proche du β -carotène (une double liaison en 4-5 au

TABLEAU I

MYXOMYCOTINA

MYXOMYCETES

Lycogala epidendronL. flavofuscumStemmitis ferruginea

EUMYCOTINA

PHYCOMYCETES

Chytridiales :

Chytridium spp.Rhizophlyctis roseaCladochytrium replicatumPleotrachelus fulgens

Blastocladales :

Blastocladiella spp.Allomyces arbusculaA. macrogynusA. moniliformisA. javanicusA. cystogena

ZYCOMYCETES

Blakeslea trisporaChoenophora cucurbitarumMucor flavusM. hiemalisPhycomyces blakesleeanusP. nitensPilobolus kleiniPl. crystallinusPl. oedipusPrésence
de
caroténoïdesNeurosporène
(IV)Lycopène
(V)Déhydro-3,4
lycopène
(VI) γ -carotène
(XVI)Torulène
(XVII)Neurosporo-
xanthine
(XXVI) β -carotène
(XXVII)Zéaxanthine
(XXIX)

Références

101, 107
167, 95
167167, 95
35
56
167, 9525
45
45, 148
45
a 45, 149
45b, 4, 30, 153
13

95, 163

69

c 58, 59, 38, 161

d 65

24

167, 95

167, 95

Ont également été identifiés :

a. : Phytoène (I), Phytofluène (II), γ -carotène (III).b. : Phytoène, Phytofluène, γ -carotène, β -zéacarotène (XV).c. : Phytoène ?, Phytofluène, γ -carotène, β -zéacarotène.d. : Phytoène ?, Phytofluène, γ -carotène.

Légende du tableau :

- : absence
+ : présence
? : résultat douteux
(+) : constituant majeur

TABLEAU II

EUMYCOTINA (suite)		Présence de caroténoïdes	Neurosporène (IV)	Lycopène (V)	Lycoxanthine (X)	Déhydro-3 4 lycopène (VI)	Dihydro-2'phillipsianaxanthine (XIII)	Phillipsianaxanthine (XIV)	α -carotène (XVI)	Aleurianaxanthine (XVIII ?)	Torulène (XVII)	Célanaxanthine (XX)	Plectanixanthine (XXI)	Déhydro-2' plectanixanthine (XXII)	Torularhodine (XXV)	Neurosporo-xanthine (XXVI)	β -carotène (XXVII)	Xanthophylles non identifiées	Caroténoïdes acides non identifiés.	Références
ASCOMYCETES																				
Endomycétales :																				
<u>Saccharomyces sp.</u>		+																		122
<u>Zygosaccharomyces spp.</u>		+																		119
<u>Pichia spp.</u>		+																		119
Aspergillales																				
<u>Aspergillus niger</u>																				165
<u>A. giganteus</u>																				57, 168
<u>Penicillium sclerotiorum</u>			+						(+)											118, 116
<u>P. multicolor</u>																				a 117
<u>P. lapidosum</u>																				117
<u>Rhizoctonia zeae</u>									+											b 117
Protomycétales																				
<u>Protomyces inundatus</u>				?					+											150
<u>P. inouyei</u>				+					+											152
<u>P. pachydermus</u>				+					+											152
Taphrinales :																				
<u>Taphrina deformans</u>																				152
<u>T. comarum</u>																				152
Clavicipitales																				
<u>Claviceps purpurea</u>																				167
<u>Epichloe typhina</u>				?																147
<u>Cordyceps militaris</u>																				55

Ont également été identifiés :

- a. : β 4 zéacarotène (XV).
b. : Phytofluène (II).

EUMYCOTINA (suite)
ASCOMYCETES (suite)

TABLEAU III	
EUMYCOTINA (suite)	
SCOMYCETES (suite)	
Pézizales	
<i>Pyronema confluens</i>	++
<i>Ascobolus spp.</i>	++
<i>Humaria ssp.</i>	
<i>Scutellinia scutellata</i>	
<i>S. spp.</i>	
<i>Melastiza miniata</i>	+
<i>Anthracobia melanoma</i>	+
<i>Saccobolus violaceus</i>	-
<i>Peziza bicolor</i>	++
<i>P. aeruginosa</i>	
<i>Aleuria aurantia</i>	+
<i>Plectania coccinea</i>	
<i>Phillipsia carminea</i>	+
<i>Cookeina sulphices</i>	
Helotiales :	
<i>Helotium citrinum</i>	+
<i>Leotia lubrica</i>	+
<i>Spathularia flavida</i>	+
<i>Dasycephala bicolor</i>	+
Erysiphales :	
<i>Oidium violaceum</i>	-
Sphaeriales :	
<i>Sphaerostible coccophila</i>	+
<i>Neurospora crassa</i>	+ +
<i>N. sitophila</i>	+
<i>Polystigma fulvum</i>	+
<i>P. rubrum</i>	?
<i>Nectria cinnabarina</i>	+
Présence de caroténoïdes	
Neurosporène (IV)	
Lycopène (V)	
Lycoxanthine (X)	
Déhydro-3,4 lycopène (VI)	
Dihydro-2' phillipsiavaxanthine (XIII)	
Phyllipsiavaxanthine (XIV)	(+)
δ -carotène (XVI)	(+) (+) (+)
Aleuriavaxanthine (XVIII ?)	+
Torulène (XVII)	++
Célavaxanthine (XX)	+
Plectaniavaxanthine (XXI)	(+)
Déhydro-2' plectaniavaxanthine (XXII)	+++
Torularhodine (XXV)	+
Neurosporexanthine (XXVI)	++
β -carotène (XXVII)	++ (+)
Xanthophylles non identifiées	++
Caroténoïdes acides non identifiés	
Références	26 167 78, 80 107 6 80 80 167 167 167, 95 167 107, 6 9 10 11 147 167 167, 95 123 167 163 a74, 107, 108 a74, 3, 107 167 101 167, 163

Ont également été identifiés

a. : Phytofluène (II), ζ -carotène (III).

TABLEAU IV

EUMYCOTINA (suite) BASIDIOMYCETES Hétérobsidiés Calocérales :		Présence de caroténoïdes	Lycopène (V)	γ -carotène (XVI)	Rubixanthine (XIX)	Torulène (XVII)	β -carotène (XXVII)	Cryptoxanthine (XXVIII)	Xanthophylles non identifiées	Caroténoïdes acides non identifiés	Références
<u>Calocera viscosa</u>		++	+	+		+	(+)	+			147 163 163 a 61 70
<u>C. cornea</u>		+		+			(+)				167, 95 101 147
<u>C. palmata</u>			?	?			(+)	+			
<u>Dacrymyces stellatus</u>							(+)				
<u>D. ellisii</u>											
Tremellales :											
<u>Ditiola radicata</u>		+					(+)				
<u>Tremella mesenterica</u>											
<u>Guepinia helvelloides</u>		-									
Uredinales :											
<u>Coleosporium senecionis</u>				+	+		+				101 15 167, 95
<u>C. pulsatilla</u>		+									12 138
<u>C. euphrasiae</u>		+					+				29 12, 15
<u>Gymnosporangium juniperinum</u>		+		(+)			+				167 12 101
<u>G. juniperi-virginianae</u>				+			+				12, 15
<u>Kunkelia nitens</u>											
<u>Melampsora aecidioides</u>		+									167 12 101
<u>M. salicicapreae</u>		+									86 12, 15
<u>Phragmidium violaceum</u>		+		+		+	+	+		+	167 167 167, 95
<u>Puccinia coronata</u>		+									
<u>P. coronifera</u>											
<u>P. graminis</u>			+			+	+				
<u>Triphragmium ulmariae</u>		+									
<u>Uredo aecidiores</u>		+									
<u>Uromyces alchemilliae</u>		+									

Ont également été identifiés :

a. : Phytoène (I), Phytofluène (II), β -carotène (III).

b. : Phytoène.

TABLEAU V

TABLEAU V											
											Présence de caroténoïdes
											Neurosporène (IV)
											Lycopène (V)
											β -carotène (XVI)
											β -carotène (XXVII)
											Echinénone (XXXII)
											Canthaxanthine (XL)
											Astaxanthine (XLIII)
											Astacine (XLIV)
											Céto-caroténoïdes non identifiés
											Références
EUMYCOTINA (suite)											
BASIDIOMYCETES (suite)											
Homobasidiés											
GASTEROMYCETES											
Nidulariales :											
<u>Sphaerobolus stellatus</u>											
Phallales :											
<u>Anthurus aseroiformis</u>											
<u>Clathrus cancellatus</u>											
<u>Lysurus hexagonus</u>											
<u>Mutinus bambusinus</u>											
<u>M. caninus</u>											
<u>Pseudocolus spp.</u>											
HYMENOMYCETES											
Aphyllorphorales :											
<u>Peniophora aurantiaca</u>											
<u>Polyporus spp.</u>											
<u>Polysticus spp.</u>											
<u>Trametes spp.</u>											
<u>Daedalea flavida</u>											
<u>Lenzites subferruginosa</u>											
<u>Ganoderma lucidus</u>											
<u>Clavaria cardinalis</u>											
<u>Cantharellus cinereus</u>											
<u>C. tubaeformis</u>											
<u>C. lutescens</u>											
<u>C. cibarius</u>											
<u>C. cinnabarinus</u>											
Agaricales :											
<u>Clitocybe venustissima</u>											
<u>Hygrophopsis aurantiaca</u>											
<u>Agaricus lacceatus</u>											
<u>Cortinarius violaceus</u>											
<u>Lactarius torminosus</u> (mycélium)											
a. : Phytofluène (II), β -carotène (III), Dihydroxy- β -carotène (VIII).											
b. : Dihydroxy- β -carotène ?											
Phytofluène ?											
Ont également été identifiés											

lieu de 5-6), relativement difficile à distinguer de certains isomères cis de celui-ci à moins d'être très pur, ce pigment des plantes vertes n'a jamais été retrouvé lors d'analyses récentes d'espèces d'où l'on avait jadis pensé l'isoler. Il en a été de même pour le δ -carotène, dont la présence avait été envisagée chez Neurospora crassa (74) et pour l'hypothétique Θ -carotène de N. crassa et N. sitophila (76). Si des résultats récents (121) militent en faveur de l'existence naturelle du lycopersène (différent du phytoène I, dont il pourrait être le précurseur, par l'absence de la double liaison centrale), sa présence chez N. crassa (68) a été infirmée par la suite (37).

3. - CONSEQUENCES CHIMIQUES, TAXINOMIQUES ET PHYLOGENETIQUES.

3.1. - Particularités de la caroténogénèse fongique : La nature et la distribution des caroténoïdes chez les champignons les distinguent le plus nettement des plantes vertes ; c'est avec certaines algues et les animaux (ceux-ci n'édifiant pas le squelette hydrocarboné des caroténoïdes mais pouvant dans certains groupes lui faire subir une oxydation progressive) que des ressemblances apparaissent, mais la caroténogénèse des champignons présente ses particularités propres.

Le premier fait qui mérite d'être relevé est l'absence de caroténoïdes dans beaucoup de groupes, alors que ces pigments sont universellement présents dans le reste du règne végétal, et existent dans le monde vivant avant même la structure cellulaire des Eucaryotes : en effet les pigments de la photosynthèse comprennent toujours, à côté des chlorophylles, des caroténoïdes, xanthophylles en particulier. La perte des caroténoïdes dans certains groupes de champignons apparaît donc comme un caractère secondaire, autorisé par la perte de l'autotrophie.

Alors que le contenu caroténoïdique des tissus chlorophylliens des plantes vertes montre une uniformité remarquable où prédominent le β -carotène et la lutéine (dihydroxy-3,3' α -carotène) au sein d'un mélange toujours complexe, les champignons peuvent n'accumuler qu'un seul pigment : ce peut être le β -carotène (XXVII) mais

aussi bien le γ -carotène (XVI) ou le lycopène (V). Ce caractère les rapproche des parties non chlorophylliennes des plantes vertes, fleurs et fruits en particulier.

De la même façon, les hydroxycaroténoïdes des champignons sont très fréquemment accumulés sous forme d'esters, ce qui, chez les plantes vertes, est le fait des tissus non chlorophylliens (63), et, dans une même cellule d'algue (*Acetabularia mediterranea*) on trouve ensemble les xanthophylles "de la photosynthèse" sous forme libre, et des hydroxycétocaroténoïdes estérifiés (44).

Mais c'est surtout par la nature des pigments formés que les champignons se caractérisent. L'extrême rareté des xanthophylles des Phanérogames - la lutéine, en particulier, n'y a jamais été rencontrée à notre connaissance - a été remarquée depuis longtemps chez les champignons ; en fait les caroténoïdes oxygénés n'y sont pas rares, mais leur métabolisme est engagé dans des voies différentes et quelquefois originales. Si les champignons ne semblent donc pas avoir utilisé la voie de l' α -carotène, ils sont les seuls Eucaryotes à avoir poussé dans la direction des carotènes monocycliques au-delà du γ -carotène ; s'ils ignorent les époxycaroténoïdes, les caroténoïdes acides en C_{40} sont leur apanage ; l'hydroxylation en 3 est chez eux rare, mais ils sont les seuls Eucaryotes également à hydrolyser les caroténoïdes en 1 et à les substituer en 2 ; des céto-4 caroténoïdes n'ont été que tout récemment mis en évidence dans des plantes supérieures (33) et, comme leurs noms l'indiquent, c'est surtout d'animaux qu'ils ont été tout d'abord isolés (échinénone XXXII, astéroïdénone XXXV, astaxanthine XLIII), puis de champignons (canthaxanthine XL) et d'algues (euglénanone XXXIV). Les capacités de synthèse propres aux champignons ne sont d'ailleurs pas caractéristiques de leur ensemble, mais sont au contraire généralement chacune le fait d'un groupe restreint et d'un niveau évolutif élevé ; aucun type de squelette, aucun mode de substitution n'est universellement représenté ; les seuls caractères communs qui se dégagent sont, ici, aussi, négatifs : absence de dérivés époxylés, grande incertitude quant à la présence du cycle α , rareté de l'hydroxylation en 3 survenant seule. Toutefois, chacun de ces caractères éloigne les champignons de la plupart des phylums végétaux, et leur réunion ne se retrouve dans aucun groupe chlorophyllien.

On voit combien la caroténogénèse des champignons s'éloigne de celle des Chlorophytes et des végétaux chlorophylliens en général. N'étant plus liée à la photosynthèse, elle a pu, soit disparaître, soit s'orienter dans des directions que, pour la même raison, retrouvent la fleur et le fruit, soit pousser plus avant dans l'oxydation, rejoignant le métabolisme animal, mais aussi et surtout s'engager ça et là dans des voies parfaitement originales. Les xanthophylles ont pu disparaître avec la photosynthèse à laquelle elles sont plus ou moins liées, ce qui expliquerait les particularités de l'hydroxylation des champignons, réapparue secondairement. De même, les pigments aliphatiques et monocycliques, dans le cas général simples intermédiaires de la synthèse des bicycliques, ont pu ici s'accumuler, la désaturation de leur squelette étant alors souvent poussée plus loin (déhydro-3,4 lycopène, torulène et dérivés) que chez les Plantes vertes.

3.2. - Implications taxinomiques : Si, chez les Algues, les caroténoïdes ont permis aux Systématiciens de distinguer les grands phylums et de préciser leurs affinités (64), ils ne sont chez les Champignons ni assez répandus, ni suffisamment connus pour pouvoir dès maintenant jouer un tel rôle. Tout au plus, au sein des Septomycètes, peut-on dire que la voie des caroténoïdes monocycliques semble davantage caractéristique des Ascomycètes ; c'est là d'ailleurs l'orientation la plus originale des caroténoïdes fongiques, et la plus riche. Les Basidiomycètes paraissent plutôt accumuler des caroténoïdes aliphatiques ou bicycliques ; les pigments appartenant à d'autres familles biogénétiques tendent à prédominer ici, en particulier dans les groupes les plus élevés.

La prise en considération des caroténoïdes a pu se révéler utile au niveau d'unités taxinomiques moyennes. Ainsi par exemple au sein des Trémellacées, la séparation en tribus des Trémellées et des Guépiniées s'est-elle trouvée confirmée par la nature de la pigmentation, les premières paraissant caroténogènes et les secondes quino-nogènes (147) ; une différence du même ordre paraît séparer, dans les Sarcoscyphacées, Sarcoscyphées et Urnulées (6) . Nul doute que les caroténoïdes puissent encore rendre de tels services au Systématicien, parmi les Hétérobasidiés et les Aphylllophorales par exemple.

Les caroténoïdes se sont révélés précieux pour la Systématique des Deutéromycètes, à la morphologie pauvre et où fait défaut le critère essentiel des formes de la reproduction sexuée. Ainsi, Cryptococcacées et Rhodotorulacées sont distinguées par la manifeste pigmentation caroténoïdique des secondes (112) . La plupart des Cryptococcus s'étant à leur tour révélés caroténogènes (120, 126, 71) , HASEGAWA et al. ont versé ceux présentant ce caractère dans les Rhodotorula alors divisées, selon la nature de leurs caroténoïdes, en Flavotorula et Rubrotorula ; mais sur la base d'autres critères, Rh. aurantiaca a été rangée dans le second sous-genre en dépit des particularités de sa pigmentation (72, 73) . De même les Rhodotorula avaient été depuis longtemps rapprochées des Sporobolomyces d'après un faisceau de caractères communs, dont la coloration ; l'analyse a validé cette façon de voir en montrant que le même complexe de caroténoïdes est en jeu dans les deux cas (101, 17, 164) et s'est vue brillamment confirmée dans ces conclusions par des études immunologiques (145) . Semblablement l'identité de leur pigmentation vient-elle étayer l'étroite affinité des genres Sporobolomyces et Sporidiobolus (49) . Mais la connaissance de leurs caroténoïdes pourrait aussi permettre, dans certains cas, de préciser les relations des Champignons imparfaits avec des groupes dont la sexualité est connue. Des travaux dans ce sens ont été entrepris pour des Deutéromycètes nématophages (154), et une meilleure connaissance des pigments des Hétérobasidiés permettra peut-être de mieux apprécier l'éventuelle parenté, envisagée par de nombreux auteurs, que pourraient avoir avec eux les Levures caroténogènes.

Au sein des Eumycètes également, les caroténoïdes peuvent permettre de limiter un genre, de préciser la position d'une espèce. Une unité systématique est parfois caractérisée par une pigmentation constante : ainsi Scutellinia scutellata et Sc. . arenosa ont-elles un contenu caroténoïdique parfaitement identique (6). Le spectre d'absorption de la solution éthéro-pétrolique globale est alors caractéristique ; ailleurs ce sont deux sous-genres qui sont ainsi définis, comme dans le cas ci-dessus décrit des Rhodotorula. La seule présence de caroténoïdes peut être un caractère déterminant, comme dans le cas déjà cité de Clitocybe venustissima ; précisons toutefois que l'absence totale ou partielle de caroténoïdes doit

être considérée avec prudence par le taxinomiste : l'exemple classique des mutations (souvent régressives) spontanées ou expérimentales en est un premier indice. En effet, l'altération d'un seul gène peut entraîner l'appauvrissement ou la perte de la caroténogénèse ; mais d'autre part sont quelquefois apparus des caroténoïdes nouveaux pour l'espèce, voire même une caroténogénèse riche et variée dans une espèce normalement colorée par de tout autres composés (155)). Or on imagine mal que les gènes nécessaires à toute une chaîne biosynthétique apparaissent ainsi de novo ; plus vraisemblablement ils pré-existaient, latents, et ont simplement été démasqués par la mutation. Il est significatif, à ce propos, que dans le cas où la synthèse de caroténoïdes s'est ainsi brusquement manifestée, le phytoène, précurseur incolore des caroténoïdes au sens strict (et qui s'accumule quand leur biogénèse est inhibée), était déjà présent (155). Il ne faut pas oublier, d'autre part, spécialement à propos d'espèces cultivées au laboratoire, quelle influence prépondérante ont les conditions de milieu sur l'élaboration des pigments des champignons. Or les potentialités réelles d'un groupe intéressent toutes - manifestes ou cachées - le Systématicien ; aussi, dans le cas présent, doit-il faire preuve de prudence avant d'attribuer une valeur absolue à tel ou tel critère, en particulier négatif, et doit-il en confronter l'apport aux autres données plus classiques.

3.3. - Application à la Phylogénèse : Après avoir aidé à déterminer les groupes systématiques et à préciser leurs affinités, la Biochimie comparée va pouvoir jouer un rôle exceptionnel dans l'établissement de leurs relations évolutives. En effet, si nous constatons que des composés A, B, C, naissent biochimiquement l'un de l'autre suivant la séquence $A \rightarrow B \rightarrow C$, on peut postuler leur apparition dans le même ordre au cours de l'évolution biologique. L'analyse fournit alors une observation non seulement orientée mais littéralement quantifiée de l'évolution. C'est ainsi que les Sarcoscyphacées, riches en pigments "terminaux" (plectanixanthine XXI, phillipsiaxanthine XIV) peuvent être considérées comme parmi les plus évolués des Discomycètes, en accord d'ailleurs avec les données cytologiques et biologiques. Notons en passant que la couleur, à elle seule, est un premier indice, bien grossier il est vrai, des niveaux relatifs d'évolution des

pigments appartenant à une même famille chimique, et donc des organismes affines qui les accumulent. En effet l'évolution le long d'une chaîne biogénétique de pigments se fait le plus généralement par oxydation progressive ⁽¹⁾; or celle-ci (désaturation, apparition de groupements C = O) conduit souvent à l'allongement du système chromophore de doubles liaisons conjuguées, ce qui se traduit par un déplacement dit bathochrome du spectre d'absorption, par un glissement de la couleur vers l'extrémité rouge du spectre : les premiers caroténoïdes (phytoène I, phytofluène II) absorbent seulement dans le proche ultra-violet (à 282 et 348 nm respectivement, en solution éthéro-pétrolique) et sont donc incolores ; le neurosporène (IV , λ_M 440 nm) donne des solutions jaune-citron, le lycopène (V , λ_M 472 nm) est le pigment de la tomate et la phillipsiaxanthine XIV, λ_M 518 nm) est franchement violette. Cette règle est évidemment loin d'avoir une portée absolue : la cyclisation, l'hydratation d'une double liaison conjuguée ont au contraire un effet hypsochrome ; mais, dans certaines limites, ce simple caractère n'est pas sans valeur. De plus, pour une même composition qualitative, les proportions des différents pigments peuvent permettre de déceler une éventuelle divergence dans la tendance évolutive : de deux champignons contenant β - et γ -carotènes, celui où le β -carotène représente la majorité de la pigmentation est nettement orienté dans la voie du squelette bicyclique, qui semble au contraire délaissée au profit de celle des carotènes monocycliques dans l'espèce où prédomine le γ -carotène. Il en est ainsi de deux Géoglossacées, d'une part Leotia lubrica (β -carotène 81 % de la pigmentation totale ; γ -carotène 12 %) et d'autre part Microglossum olivaceum (β -carotène 23 % et γ -carotène 73 %) (6). Les résultats obtenus par N. ARPIN permettent de considérer les Discomycètes comme un groupe auquel ces modes de raisonnement s'appliquent de façon particulièrement démonstrative.

(1) - Le même sens évolutif avait déjà été postulé par LEBRETON (100) dans le cas des flavonoïdes et semble donc pouvoir être généralisé. Notons d'ailleurs que l'Evolution se déroule ainsi dans le sens de l'entropie croissante, obéissant à la loi thermodynamique bien connue.

Toutefois l'application de ce principe de récapitulation de la phylogénèse par la biogénèse - renaissance ici pleinement justifiée de la Loi de HAECKEL, où la superposition de l'évolution chimique et de l'évolution biologique permet d'analyser celle-ci par celle-là - ne doit pas être conduite sans prudence : une dérivation phylétique peut s'accompagner aussi bien de la perte que du gain de capacités biogénétiques, et, parcourant des chaînes réactionnelles, l'évolution peut ici "revenir en arrière"('). D'ailleurs les champignons dans leur ensemble ne dérivent-ils pas d'organismes chlorophylliens, donc tous caroténogènes ? D'après leur répartition, on peut fixer approximativement au lycopène, au γ -carotène et au β -carotène les limites du "patrimoine" originel des champignons ; et, autant que son développement, la disparition de cette famille de pigments est ici un fait d'évolution. Voici un exemple où chaînes biosynthétiques et phylétiques semblent effectivement opposées : parmi les Rhodotorula, vraisemblablement à partir du γ -carotène, les Rubrotorula accumulent la torularhodine (XXV), les Flavotorula principalement le β -carotène (XXVII) ; la pigmentation de celles-ci apparaît donc comme plus "primitive". Cependant la torularhodine existe dans des genres proches, mais morphologiquement moins spécialisés (Sporidiobolus, Sporobolomyces) ; il apparaît donc, et bien d'autres caractères le montrent, que les levures caroténogènes "jaunes" dérivent des "rouges" par perte ou inhibition d'un certain nombre de capacités (72, 73, 145).

Dans le double cadre du Laboratoire de Mycologie associé au Centre National de la Recherche Scientifique et du Service de Phytochimie et Phytophysologie du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Lyon, une Equipe est née, qui s'attache à l'étude, dans une optique taxinomique - pour l'instant - des produits du métabolisme fongique, pigments essentiellement.

(') - On peut retrouver ici l'opposition classique entre microévolution souvent régressive d'une structure (ici chimique et non morphologique ou anatomique) et macroévolution créatrice de structures nouvelles.

Monsieur N. ARPIN s'étant actuellement axé sur les Discomycètes, groupe vaste et riche en caroténoïdes variés et souvent originaux, nous avons été amené à entreprendre ce "survol" de la caroténogénèse chez les Basidiomycètes. Outre l'intérêt propre à son caractère général lui-même, une telle étude était amenée à cerner les groupes systématiques où la recherche détaillée des caroténoïdes se révélerait particulièrement prometteuse du point de vue taxinomique, voire à déceler telle espèce particulièrement propice à d'ultérieures études de la physiologie de cette famille de pigments.

1. - MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. - Cultures : Les organismes cultivés au laboratoire l'ont été, sauf mention spéciale, selon le processus suivant, élaboré après divers essais : Une préculture de la souche étudiée est réalisée sur milieu glucosé liquide de Wickerham (160) (tubes utilisés pour les essais d'assimilation lors de la détermination des Levures (20) , placés à l'étuve sous agitation à une température de 25° C). Après 3 jours de développement, 2 cm³ de cette suspension ensemencent 500 cm³ de milieu de culture liquide contenus dans un récipient cylindrique vertical de 1,25 l., permettant un barbotage d'air stérile. Ce milieu de culture est ainsi composé :

Glucose massé	20 g.
Maltea "Moser"	2 g.
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1 g.
KH ₂ PO ₄	0,5 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g.
H ₂ O	q.s.p. 1 litre.

Comme il a été remarqué (72) , des milieux de culture purement synthétiques produisent souvent, dans le cas des Levures caroténogènes tout au moins, une pigmentation relativement médiocre. Le milieu de culture choisi ici fournit d'aussi bons résultats que celui à la levure et à la pomme de terre (72, 73) , tout en étant de préparation incomparablement plus facile.

La température est maintenue à 25° C, les cultures reçoivent un éclairage quotidien de 2000 lx de lumière blanche pendant 6 h. Après 9 jours de croissance, levures ou hyphes sont rassemblés et lavés par centrifugation.

1.2. - Récoltes : Les carpophores récoltés dans la nature proviennent, sauf indication contraire, de la proche région lyonnaise ('). Le plus rapidement possible, ces échantillons sont nettoyés soigneusement et placés dans l'acétone. Dans le cas des espèces épixyles -encroûtantes en particulier - les fructifications sont délicatement décollées du support ; une légère contamination chlorophyllienne (algues...) du matériel fongique est cependant inévitable dans ce cas, en dépit de tout le soin apporté à son isolement.

-21-

1.3. Conservation : Dans tous les cas, le matériel ainsi obtenu est conservé jusqu'à son analyse dans l'acétone, au congélateur ; en le déshydratant, ce solvant prépare l'extraction ultérieure de ses pigments lipophiles.

MATERIEL ET TECHNIQUES
2. - DETERMINATION DES PIGMENTS

2.1. - Relations entre structure chimique et propriétés physiques : L'actuel protocole général de séparation et de caractérisation des caroténoïdes utilise essentiellement, d'une part la distribution de ces pigments entre deux phases (partage entre solvants non miscibles et chromatographie d'adsorption), d'autre part leurs propriétés spectrales, en premier lieu d'absorption dans le visible. Aussi rappellerons-nous d'abord brièvement les relations qui ont pu être établies entre la structure chimique des divers caroténoïdes et leurs propriétés dans ces domaines.

2.1.1. - Relations entre partage et structure. L'analyse d'un mélange complexe de caroténoïdes a longtemps commencé par son partage entre deux solvants non miscibles : hydrocarbure et alcool aqueux très généralement. D'après le principe similia similibus solvuntur, les hydrocarbures se solubilisent dans l'épiphase, les xanthophylles sont au contraire bien solubles dans l'alcool. D'une façon plus élaborée (36), la solution éthéro-pétrolique peut d'abord être extraite plusieurs fois par le méthanol à 90 %, qui entraîne les xanthophylles polyhydroxylées ; les autres caroténoïdes restent dans l'épiphase, qui est ensuite

(') - Nous remercions Monsieur BUSSY, Vice-Président de la Société Linnéenne de Lyon, qui nous a procuré des échantillons d'espèces souvent rares.

Tableau VII

=====

Coefficients de partage de divers pigments entre l'éther de pétrole et le méthanol à 95 % (d'après PETRACEK et ZECHMEISTER (127)).

Hydrocarbures		100 : 0
Dipalmitate de la zéaxanthine	$2 - O - \underset{\underset{O}{ }}{C} - C_{17}H_{35}$	100 : 0
Ethoxy-4 -carotène	$1 - O - C_2H_5$	99 : 1
Echinénone (XXXII)	$1 = O$	93 : 7
Diacétate de l'isozéaxanthine	$2 - O - \underset{\underset{O}{ }}{C} - CH_3$	86 : 14
Isocryptoxanthine (XXXI)	$1 - OH$ (allylique)	86 : 14
Cryptoxanthine (XXVIII)	$1 - OH$	82 : 18
Canthaxanthine (XL)	$2 = O$	50 : 50
Céto-4 hydroxy-4' -carotène	$1 = O + 1 - OH$	36 : 64
Isozéaxanthine (XXXVIII)	$2 - OH$ (allyliques)	22 : 78
Zéaxanthine (XXIX)	$2 - OH$	11 : 89
Astacine (XLIV)	$4 = O$	08 : 92

affrontée à du méthanol à 95 % où passent les caroténoïdes monohydroxylés. Un tel processus est actuellement de moins en moins utilisé, par suite du développement des techniques chromatographiques, et de la solubilité intermédiaire de nombreux caroténoïdes naturels, que l'on retrouve donc dans les différentes phases. Il reste cependant intéressant dans le cas où l'un des pigments présents possède une solubilité très particulière (acide, glycoside).

La mesure du coefficient de partage d'un pigment isolé est par contre un utile critère de caractérisation et de détermination de structure. PETRACEK et ZECHMEISTER (127) ont mesuré, dans des conditions définies, le partage d'un certain nombre de caroténoïdes entre l'hexane et le méthanol à 95 ou 85 %. Le comportement, dans le premier système, des principaux types représentatifs est indiqué dans le tableau VII. L'hexane peut être remplacé par l'éther de pétrole (Eb. 40-60° C) couramment employé dans la chimie des caroténoïdes, sans modification sensible des résultats (103) .

KRINSKY (96) a choisi comme indice de l'hydrophilie d'un caroténoïde la concentration du méthanol telle que le pigment se partage également entre les deux phases, ou " M_{50} " ; il observe d'ailleurs qu'entre certaines limites, il existe une relation linéaire entre le coefficient de partage et le degré d'hydratation du méthanol utilisé. Selon ce auteur, l'hydrophilie d'un caroténoïde est très sensiblement la somme des actions propres à chacun des radicaux qu'il porte ; en prenant comme unité l'hydrophilie d'un hydroxyle non allylique, il est conduit à attribuer les valeurs relatives suivantes aux différentes fonctions des pigments étudiés :

Epoxide 5,8	: 0,24
Epoxide 5,6	: 0,24
Ester acétique	: 0,47
Cétone	: 0,72
Hydroxyle allylique	: 0,89

Une abaque permet de convertir en cette unité le M_{50} d'un caroténoïde, déterminé directement, ou graphiquement à partir de plusieurs mesures dans des systèmes différents. Il doit être noté toutefois que, si ni les doubles liaisons isolées ni la nature des hydroxyles n'influencent significativement le coefficient de partage, le caractère hypophasique

d'une xanthophylle aliphatique croît avec la longueur de sa chaîne polyénique conjuguée (103).

Les résultats obtenus par KRINSKY ont, dans leur ensemble, été confirmés par l'étude de SUBBARAYAN et al. (140).

La détermination de leur coefficient de partage constitue donc une méthode très intéressante d'analyse structurale - nombre, nature et position des radicaux - des caroténoïdes, quand toutefois leur hydrophilie n'est pas trop élevée (111). Plus encore peut-être, la modification de ce caractère après telle ou telle réaction caractéristique (acétylation, méthylation, réduction,...) est fort instructive (96). Mais l'application de cette technique est restée limitée car elle s'est vue éclipsée par le succès de la chromatographie à l'échelle analytique, sur papier ou sur couche mince, l'usage s'étant toutefois établi dans beaucoup d'équipes de Recherche, d'indiquer, entre autres caractères, son coefficient de partage dans au moins un système de solvants lors de la description d'un caroténoïde nouveau.

Notons au passage qu'un autre critère de la solubilité relative d'un composé est son comportement en chromatographie de partage. Ainsi EGGER (43), utilisant comme phase stationnaire de la cellulose imprégnée d'huile (minérale ou végétale, selon la plus ou moins grande lipophilie des composés étudiés), et comme phase mobile un mélange, en proportions convenables, d'acétone et de méthanol aqueux, observe qu'en valeur absolue $1 - \text{OH} \neq 1,5$ $\text{C} = \text{O} = 2$ esters, hydroxyle et carbonyle jouant évidemment en sens inverse de l'ester.

2.1.2. - Relations entre adsorption et structure. Un composé est d'autant plus retenu par un adsorbant polaire qu'il acquiert, du fait de l'attraction électrostatique de celui-ci, une plus grande dissymétrie électronique. Les fonctions oxygénées des xanthophylles jouent un rôle de premier plan dans le phénomène, l'oxygène tendant à attirer le doublet électronique de la liaison carbone-oxygène ; l'ordre de polarité croissante est sensiblement celui de l'hydrophilie (140). Les radicaux les plus polaires sont les carboxyles et hydroxyles à caractère acide (énol α cétonique), puis les hydroxyles, les carbonyles, les époxydes. L'influence d'un alcool est considérablement minimisée par sa substitution (éther, ester). En chromatographie sur couche

TABLEAU VIII - Propriétés chromatographiques de divers caroténoïdes sur papier Schleicher & Schüll n° 287 (d'après JENSEN et LIAAEN, JENSEN (93) ARPIN et LIAAEN JENSEN (9, 10, 11), AASEN et LIAAEN JENSEN (2)).

Caroténoïdes	0*	Valeurs R _f			10*	20*
		2*	5*f			
β-carotène (XXVII)	0,95					
γ-carotène (XVI)	0,68					
Neurosporène (IV)	0,66					
Chlorobactène	0,62					
Lycopène (V)	0,53	0,68				
Cryptoxanthine (XXVIII)	0,29	0,62	0,81		0,91	
Torulène (XVII)	0,25					
Diester de la plectania-xanthine		0,47	0,80			
Chloroxanthine (IX)	0,13	0,46	0,73		0,90	
Déhydro-3,4 torulène		0,35				
Ester méthylique de la torularhodine			0,58		0,90	
Déhydro-2' plectaniaxanthine ester			0,57		0,90	
Déhydro-3,4 lycopène (VI)			0,52			
Spirilloxanthine (XII)		0,18	0,40		0,76	
Déhydro-2' plectaniaxanthine (XXII)			0,40		0,75	
Rhodopine			0,39		0,75	
Lutéine			0,39		0,72	
Zéaxanthine (XXIX)		0,09	0,30		0,59	
Aldéhyde de la torularhodine (XXIV)			0,29			
Astaxanthine (XLIIII)					0,57	
Plectaniaxanthine (XXI)					0,45	
Diester de la phillipsiavaxanthine					0,35	
Alcool de la torularhodine (XXIII)			0,19			
Phillipsiavaxanthine (XIV)						0,36
Torularhodine (XXV)					0,10	

(*) %Acétone dans éther de pétrole.

mince, les relations quantitatives suivantes ont pu être établies :

1 - OH $\neq$ 1,5 C = O $\neq$ 4-5 5-O - $\underset{\text{O}}{\text{C}}$ - R (acides gras de C₁₀ à C₂₀)

(43) .Quant au squelette hydrocarboné, son adsorbabilité est d'autant plus forte que le système polyénique est plus long, la cyclisation entraînant une diminution de la polarité. Les doubles liaisons éthyléniques isolées augmentent la polarité de la molécule, mais à un degré variable suivant leur position ; enfin, un cycle benzénique se révèle à peine plus polaire que s'il ne portait qu'une seule double liaison conjuguée au reste de la molécule (110) . L'isomérisation trans $\rightarrow$ cis peut entraîner un changement de la polarité dans l'un ou l'autre sens, sans qu'une relation générale puisse être établie entre cette modification et celle apportée au squelette (36) . Notons enfin que, pour les plus polaires d'entre eux surtout, l'ordre d'adsorption relative des caroténoïdes peut varier légèrement d'un système chromatographique à un autre (62) , l'étude systématique de ces différences pouvant se révéler une source d'information structurale (93, 140) .

2.1.3. - Relations entre absorption U.V. -visible et structure. La spectrométrie d'absorption dans le visible et le proche ultra-violet, première méthode spectrale utilisée -d'abord sous la forme simple de la spectroscopie - pour la caractérisation de tant de composés organiques, est d'emploi constant dans l'étude des caroténoïdes. Parmi les nombreuses publications récentes consacrées à ce sujet, ou l'abordant, citons celles de KARRER et JUCKER (94) , DALE (33,34) , GOODWIN (62) , ZECHMEISTER (166) , WEEDON (159) , ISLER et al. (87, 88, 89) , DAVIES (36) , LIAAEN JENSEN et JENSEN (111) et bien entendu l'ouvrage général de SCOTT (133) .

2.1.3.1. - Aspects qualitatifs.

a) Caractères généraux de l'absorption des polyènes aliphatiques.

Le spectre d'absorption des caroténoïdes présente fondamentalement trois pics dans le visible - ou le proche ultra-violet pour les moins insaturés d'entre eux, tels que le phytoène (I). Le pic médian possède la plus forte densité optique et sert à repérer et comparer les différents pigments ; des deux autres, celui de plus forte longueur d'onde

est toujours nettement le plus marqué. La position des λ_{Max} comme la forme du spectre sont largement influencées par la nature du solvant (Tabl. IX) ; le plus généralement utilisé est l'éther de pétrole.

Depuis déjà d'assez nombreuses années, et depuis surtout les travaux de KARREER et JUCKER (94) , on connaît la relation entre la longueur d'onde au maximum d'absorption et le nombre de doubles liaisons conjuguées du système polyénique des caroténoïdes. Ceux-ci, comme tous les polyènes, absorbent à des longueurs d'onde d'autant plus grandes que le nombre de doubles liaisons conjuguées est lui-même plus élevé, les méthyles substituants jouant en outre chacun comme un quart de double liaison (133) .

Mais cette augmentation du λ_{Max} avec le nombre de doubles liaisons conjuguées n'est pas constante, diminuant régulièrement de 25 à 7 nm par double liaison lorsque le nombre initial de celles-ci passe de 5 à 15 (111) .

Corrélativement le λ_{Max} d'un carotène de structure inconnue permet d'estimer le nombre de doubles liaisons constituant son chromophore, par comparaison avec les valeurs connues pour des composés de référence (tableau X). En pratique des courbes ont été tracées (33, 159) à partir de telles valeurs, permettant de déterminer graphiquement le nombre de doubles liaisons. Toutefois l'incrément spectral diminuant régulièrement quand le nombre de doubles liaisons augmente, les courbes s'infléchissent et rendent rapidement les interpolations imprécises. Or on constate qu'en traduisant de telles données dans des coordonnées semi-logarithmiques, une relation linéaire beaucoup plus commode est obtenue (Fig. 4). Une telle loi peut d'ailleurs se démontrer par intégration de l'équation :

$$\frac{d\lambda}{dn} = \frac{K}{n} \quad (\text{où } n = \text{nombre de doubles liaisons}) ;$$

$$\int d\lambda = K \int \frac{dn}{n} \quad \text{d'où} \quad \lambda = \underline{a} \log.n + \underline{b}$$

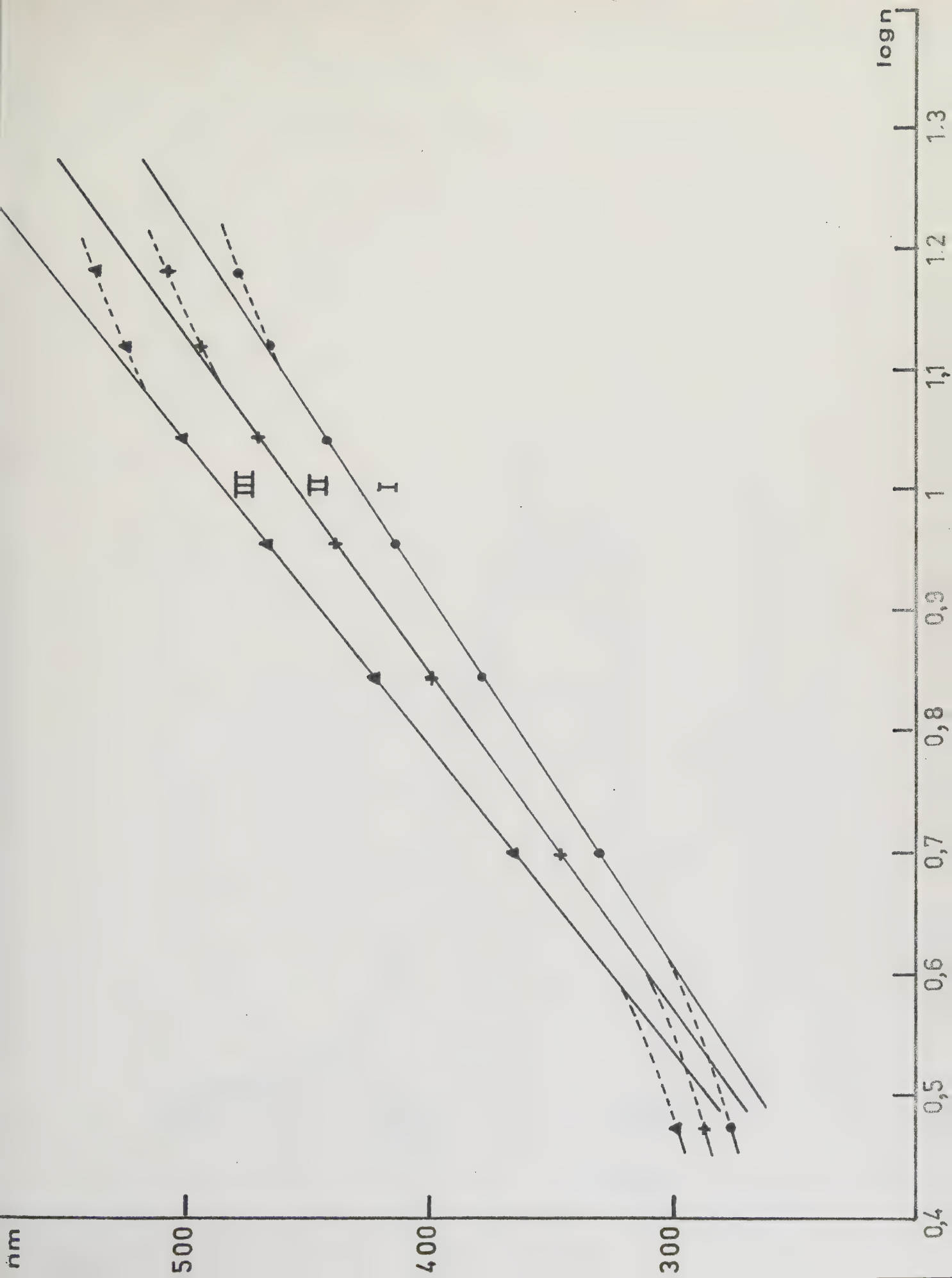
Dans le cas présent la méthode graphique donne pour a la valeur de 367 et pour b la valeur de 90 nm ; les deux autres pics obéissent à des lois analogues. Une telle relation logarithmique entre la cause (circulation électronique dans les doubles liaisons) et l'effet

TABLEAU IX. - Absorptions principales (nm) de divers carotènes dans des solvants variés.

	Ether de pétrole	Benzène	Chloroforme	Sulfure de carbone	Référence
Lycopène	446 472 506	455 487 522	456 485 520	477 507 548	(90, 62)
γ -carotène	437 462 494	447 477 510	447 475 508	463 496 533	(90, 62)
β -carotène	425 451 482	466	466 497	450 485 520	(62)
ξ -carotène	419 444 475	434 452 487	433 452 483	449 470 501	(90, 62)
ζ -carotène	428 458 490	445 467 501	440 470 503	457 490 526	(62)

TABLEAU X. -- Effet de l'augmentation du nombre des doubles liaisons sur les positions des longueurs d'onde des maxima d'absorption.

Composé	Nombre de doubles liaisons conjuguées	Maxima d'absorption (nm.) (éther de pétrole)	Référence
Phytoène (I)	3	276, 286, 298	(90)
Phytofluène (II)	5	331, 347, 366	(90)
β -carotène (III)	7	380, 401, 425	(90)
Neurosporène (IV)	9	416, 440, 470	(90)
Lycopène (V)	11	443, 472, 504	(90)
Déhydro-3, 4 lycopène (VI)	13	465, 494, 528	(105)
Bisdéhydro-3, 3', 4, 4' lycopène (VII)	15	480, 510, 540	(141)



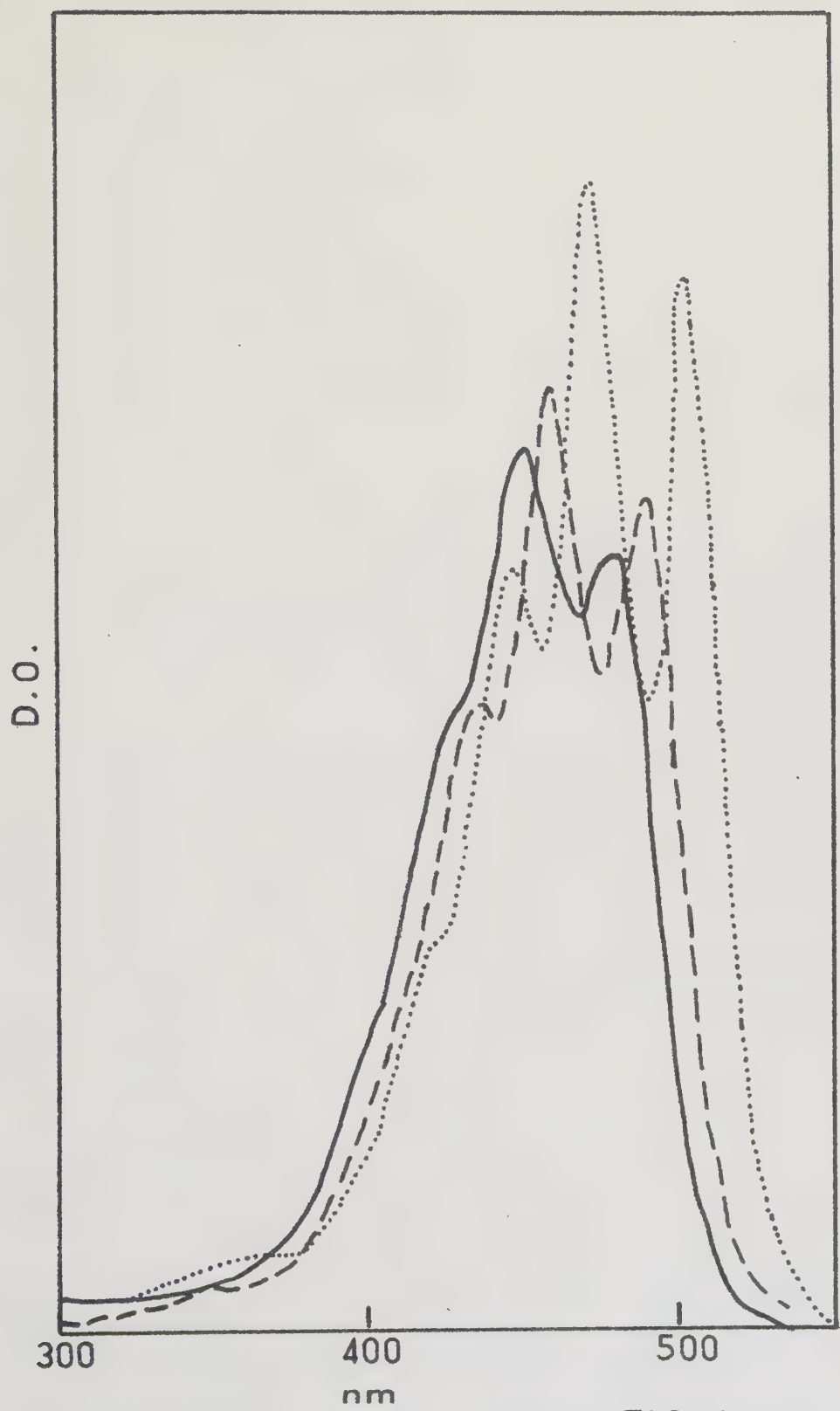


FIG: 5.

(maximum d'absorption spectral) amène à penser que l'oscillation du chromophore est de type "auto-amorti".

Toutefois la relation n'est strictement linéaire que pour des valeurs de n comprises entre 3 et 13 ; en deça et au-delà la courbe s'infléchit. Il est à noter d'ailleurs qu'un carotène aliphatique en C_{40} ne peut contenir plus de 15 doubles liaisons et la limite de linéarité $n = 13$ correspond à l'entrée en résonance des doubles liaisons terminales, phénomène qui doit augmenter l'amortissement du système. La limite inférieure de trois doubles liaisons correspond à un chromophore non substitué, entièrement situé entre deux méthyles, ce qui souligne à nouveau l'influence de ce groupement sur la conjugaison du système polyénique.

Mais le profil spectral également varie avec le nombre de doubles liaisons conjuguées : les spectres électroniques des carotènes aliphatiques présentent une acuité de plus en plus prononcée du phytoène au neurosporène, puis regressent nettement à partir du déhydro-3, 4 lycopène.

b) Variations de l'absorption fondamentale.

Les propriétés U.V.-visible des caroténoïdes varient beaucoup, tant au niveau des λ_{Max} que de la forme du spectre, en fonction des trois grands types de facteurs suivants ;

- la nature de l'extrémité de la chaîne polyénique ;
- la présence de groupements carbonyles conjugués avec le chromophore polyénique ;
- la configuration cis-trans.

1) La nature des extrémités de la molécule.

.....
 Dans l'extrémité de type β -carotène, la double liaison en 5-6, à l'intérieur du cycle terminal, provoque un allongement du chromophore égal au tiers de l'apport de la double liaison correspondante d'un carotène aliphatique (109) (Tableau XI), ceci correspondant à une diminution de sa conjugaison avec la chaîne polyénique.

Comme la longueur d'onde, la structure fine du spectre diminue par cyclisation : le profil spectral, caractérisé par trois pics nettement marqués dans les caroténoïdes aliphatiques s'émousse progressivement

lorsque l'on passe aux caroténoïdes monocycliques puis bicycliques. LIAABN JENSEN (103) a choisi le rapport de la hauteur relative du pic de plus grande longueur d'onde (III) au pic médian (II) comme caractéristique de ce profil : il est de 0,80 pour le lycopène (V) ; de 0,60 pour le γ -carotène (XVI) et de 0,33 pour le β -carotène (XXVII) (formes trans). Corrélativement le pic de plus faible longueur d'onde s'estompe pour n'être plus représenté que sous la forme d'un épaulement dans le cas du β -carotène. Par ailleurs, la valeur relative des densités optiques du minimum d'absorption entre les pics II et III et du pic I varie également selon la nature du squelette : la première est plus faible pour les caroténoïdes aliphatiques, plus forte pour les caroténoïdes bicycliques. Les caroténoïdes monocycliques ont une position intermédiaire et variable selon l'importance relative des portions du chromophore aliphatique et cyclique.

Bien entendu, la cyclisation n'agit sur le spectre que si elle intéresse le chromophore : l' ϵ -carotène, dont les deux doubles liaisons extrêmes, seules comprises dans les cycles terminaux, ne sont pas conjuguées au reste de la molécule, présente un spectre comparable à celui du neurosporène, dont il possède la chromophore.

L'absorption des rétro-caroténoïdes (chez qui tout le système de doubles liaisons conjuguées a subi un déplacement d'un carbone, si bien que la chaîne centrale s'attache aux extrémités par une double liaison), pour un même nombre de doubles liaisons conjuguées, se situe entre celle des caroténoïdes cycliques normaux et celle des aliphatiques : leur double liaison dans le cycle est plus conjuguée que celle du β -carotène.

Le concours des extrémités aromatiques de certains caroténoïdes (bactériens) au chromophore de la molécule varie avec leur substitution; en particulier, une extrémité du type triméthyl-1,2,5 phényle a exactement le même effet qu'un cycle terminal de β -carotène (109) .

ii) L'introduction de groupements oxygénés.

Elle agit qualitativement sur le spectre si elle fait disparaître (par hydratation conduisant à un hydroxyle; de même les groupements époxydes et furanoïdes) ou apparaître (carbonyle) une double liaison conjuguée au chromophore.

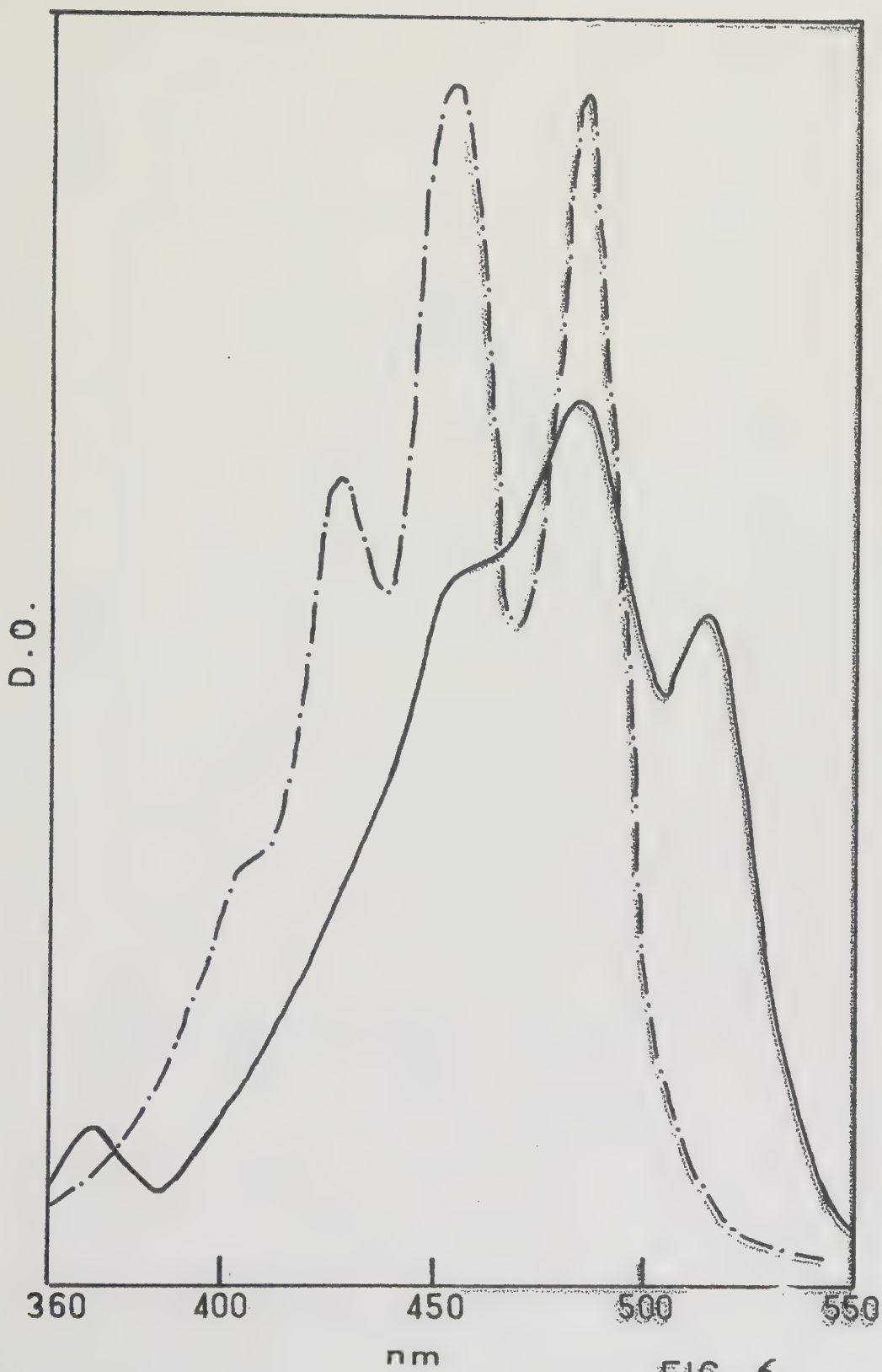


FIG : 6.

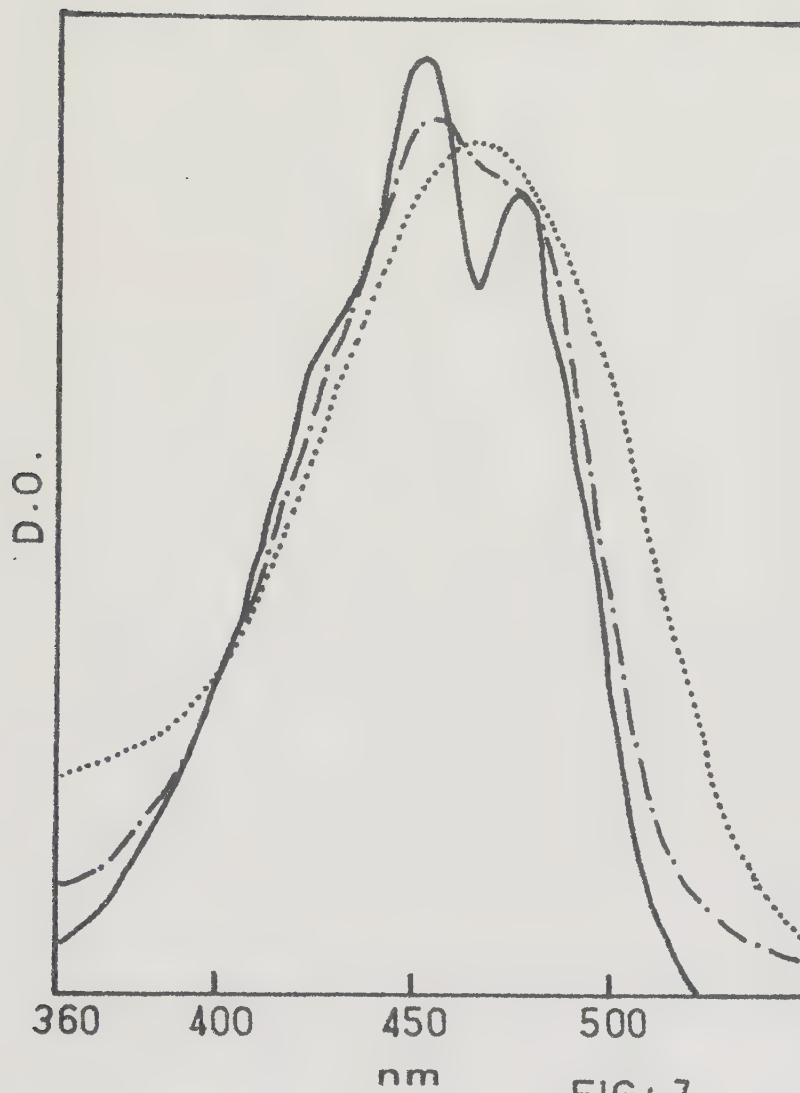


FIG: 7.

TABLEAU XI. - Différents effets bathochromes des groupements carbonyles.

Composés	Absorption principale (nm., éther de pétrole) ou hexane (*)	Déplacement spectral (nm.)	Référence
Sphéroïdène	455	28	(105-106)
Sphéroïdénone	483		
Spirilloxanthine	494	24	(103-104)
P. 518	518		
Plectanixanthine	474		
Déhydro-2' plectanixanthine	503	29	(6)
Torulène	484		
Céto-4 torulène	489,5	5,5	(90-2)
Retro-déhydro- β -carotène	472		
Céto-3-retro déhydro- β -carotène	483,5	11,5	(90-90)
β -carotène	450		
Echinénone	458	8	(94-36)
Canthaxanthine	465	7	(90)

* . Solvant : hexane

La conjugaison d'un groupement carbonyle avec le système polyénique produit trois effets marqués : nette diminution de la structure fine du spectre, déplacement bathochrome, effet hypochrome. Les deux premiers sont illustrés par les figures 6 et 7 et sont explicités ci-dessous ; le troisième effet, quantitatif, sera illustré plus loin.

On observe des effets bathochromes très différents selon que l'introduction d'un groupement carbonyle se fait sur des extrémités cycliques ou aliphatiques : comparativement au déplacement bathochrome observé chez les caroténoïdes aliphatiques (déplacement pouvant atteindre 28 nm), celui des cycliques est beaucoup plus restreint (7 - 8 nm) ; les céto-rétro-caroténoïdes ont là aussi une position intermédiaire (Tableau XI).

La présence d'un second groupement carbonyle conjugué à l'autre extrémité de la molécule (carbonyles en position ω - ω') se traduit très différemment dans un caroténoïde à chaîne ouverte et dans un caroténoïde bicyclique (111) . Dans le premier cas, ce deuxième carbonyle n'a qu'un effet bathochrome faible : on n'observe en effet que 24 nm de différence entre la spirilloxanthine et son homologue disubstitué, P. 518, ce qui avait laissé croire que ce dernier n'était qu'un monocétocaroténoïde (104) . Pour les cycliques, au contraire, le second carbonyle a un effet bathochrome égal au premier (voir dans le tableau XI les λ_{Max} de β -carotène, échinénone et canthaxanthine).

Dans le cas très particulier de groupements cétoniques vici-
naux (comme dans l'astacine, positions 3, 4), il n'y a pas de différence sensible entre le dérivé dicétonique et le dérivé monosubstitué où le carbonyle (en ⁴ ici) est conjugué avec le chromophore.

Un groupement carbonyle peut se présenter sous différentes formes : cétone, aldéhyde, acide ou ester. LIAAEN JENSEN (111) a montré que pour les esters carboxyliques conjugués le déplacement bathochrome est plus limité que pour les autres carbonyles. C'est ainsi que les maxima d'absorption de la torularhodine et de son aldéhyde se situent à 507 nm, tandis que l'ester méthylique de la torularhodine absorbe à 497 nm seulement (11, 90, 89) : le déplacement n'est ainsi que de 13 nm par rapport au torulène alors qu'il est de 23 pour l'acide.

iii) La configuration cis-trans des caroténoïdes.

Nous avons jusqu'ici envisagé uniquement le problème des caroténoïdes dans lesquels toutes les doubles liaisons se trouvent sous la forme trans, ce qui est le cas général pour les produits naturels. Différents facteurs (lumière, température, oxygène, iode) provoquent l'isomérisation d'une ou de plusieurs doubles liaisons de la forme trans à la forme cis. ZECHMEISTER (166) a étudié d'une façon très détaillée les caractéristiques spectrales de ces isomères cis. Le spectre électronique d'un caroténoïde cis se différencie de celui du composé entièrement trans par quelques particularités, tant dans la partie visible qu'ultra-violet. Résumons les :

1°) Les pics d'absorption sont déplacés vers les plus faibles longueurs d'onde ;

2°) la structure fine du spectre diminue nettement. LIAAEN JENSEN (103) a défini des rapports permettant de se rendre compte de l'isomérisation plus ou moins grande d'un composé originellement trans.

3°) Mais la caractéristique principale d'un isomère cis est l'apparition dans le proche UV (à environ - 140 nm du pic de plus grande longueur d'onde) d'un pic qui peut se dédoubler dans le cas des carotènes aliphatiques.

Remarque : on se souviendra que dans le proche UV, outre les carotènes incolores absorbent d'autres substances lipophiles comme divers stéroïdes. Ainsi, chez les Champignons, est très fréquemment rencontré l'ergostérol (deux doubles liaisons conjuguées en 5,6 et 7,8) dont le spectre d'absorption dans l'ultra-violet présente une certaine parenté (λ_M (260)270, 282 et 294 nm) avec celui du phytoène (I) (λ_M 276, 286 et 298 nm).

2.1.3.2. - Aspect quantitatif.

Pour une épaisseur de solution traversée et une concentration données, à chaque longueur d'onde - et en particulier au maximum de densité optique - l'absorption de la lumière par un composé est une fonction de sa nature, qui peut être exprimée par ses coefficients d'extinction spécifique ou molaire. Le premier s'exprime en valeurs

Tableau XII - Coefficients d'extinction spécifiques de divers caroténoïdes.

Caroténoïdes	Σ	λ_{Max}	Références
Phytoène	49,800	286(EP)	(39)
Phytofluène	85,500	347(EP)	(39)
ψ -carotène	138,000	400(EP)	(39)
Neurosporène	155,000	440(EP)	(39)
Lycopène	185,500	472(EP)	(111)
γ -carotène	166,200	462(EP)	(111)
β -carotène	137,200	451(EP)	(111)
α -carotène	150,000	444(EP)	(90)
ξ -carotène	154,900	444(EP)	(90)
Rétro-déhydro- β -carotène	171,800	472(EP)	(90)
Céto-3 rétro-déhydro- β -carotène	142,500	483,5(H)	(48)
Echinénone	120,800	458(EP)	(36)
Canthaxanthine	111,000	468(H)	(47)
Cryptoxanthine	135,500	451(H)	(62)
Zéaxanthine	133,000	451(H)	(62)
Torularhodine	115,000	507(EP)	(90)
Eschscholtzanthine	185,600	464(H)	(90)
Rhodoxanthine	140,200	490(H)	(48)

H : hexane.

EP : éther de pétrole.

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (densité optique correspondant à l'absorption de 1 cm d'épaisseur d'une solution de 10 mg de substance dissous dans 1 cm³ de solvant), le second est symbolisé ϵ ($\epsilon = E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \frac{M}{10}$, M étant la masse moléculaire du composé).

Pour un solvant donné et une longueur d'onde définie, la valeur de ce coefficient est une constante du produit et sa mesure permet :

- d'en éprouver la pureté ;

- d'obtenir des indications sur sa nature même, la valeur de ce coefficient variant beaucoup d'un caroténoïde à l'autre, comme l'indique le Tableau XII. On voit que :

- dans la série des caroténoïdes aliphatiques, l'absorption augmente régulièrement depuis le phytoène jusqu'au lycopène (ce dernier possédant la plus grande valeur connue chez les caroténoïdes) ;

- le passage des caroténoïdes aliphatiques aux bicycliques homologues s'accompagne d'une brusque diminution de l'absorption, comme le montre la comparaison des valeurs du lycopène, du γ -carotène et du β -carotène ;

- l'introduction d'un groupement carbonyle a un effet hypochrome très sensible : du β -carotène à l'échinénone, l'absorption diminue de 20 % ;

- les systèmes rétro ont ici aussi une absorption intermédiaire entre celles des caroténoïdes cycliques et aliphatiques normaux, aussi bien pour les hydrocarbures que pour les composés carbonylés.

Inversement, l'absorption spécifique d'un caroténoïde en permet le dosage : si, à son λ_{Max} , une solution de volume V cm³ d'un composé de coefficient $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ présente une densité optique DO (mesurée sur une épaisseur traversée de 1 cm), le poids P de pigment, exprimé en mg, sera donné par :

$$P = \frac{DO \times V \times 10}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

2.2. - Processus analytique : Toutes les opérations ci-dessous décrites se font à l'obscurité ou en lumière diffuse. Les fractions isolées sont conservées sous azote au congélateur. Les réactions chimiques non immédiates sont conduites généralement sous azote, à des températures propres à chaque cas.

2.2.1. - Extraction. Le matériel biologique, déshydraté par son séjour dans l'acétone, est traité par le même solvant, à froid (par broyage dans un mortier pour les petits échantillons, à l'aide d'un "mixer" ménager pour ceux plus importants), renouvelé jusqu'à obtention d'un extrait incolore. Cette extraction est en général aisée, la majeure partie des caroténoïdes étant le plus souvent entraînée lors du premier broyage du matériel dans l'acétone pure. Dans quelques cas cependant, ce solvant peut être avantageusement renforcé par enrichissement de 20 % de méthanol, et l'épuisement du broyat est alors achevé en le laissant une nuit dans le méthanol, au réfrigérateur. Le résidu d'extraction est conservé pour détermination de son poids sec.

Quelque soit le procédé d'extraction utilisé, les solutions obtenues sont additionnées d'éther de pétrole (Eb. 40-60° C) et de la quantité d'eau nécessaire à la séparation de deux phases : après agitation et décantation, les caroténoïdes se retrouvent dans l'éther de pétrole, phase supérieure. Il peut être nécessaire de recommencer cette opération pour recueillir la totalité des caroténoïdes, mais il est fréquent que l'hypophase hydro-acétonique reste colorée par des pigments de nature différente.

La solution éthéro-pétrolique est lavée plusieurs fois à l'eau (pure, ou d'abord contenant 20 % de chlorure de sodium ou de sulfate d'ammonium si des émulsions trop importantes ont tendance à apparaître) pour en éliminer toute trace d'acétone, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. Son spectre d'absorption dans le visible et l'ultra-violet est alors quantitativement enregistré (Spectrophotomètre enregistreur Beckman DB). Outre les indications qualitatives que dans bien des cas il apporte, il permet de déterminer la quantité totale de pigments présents dans l'extrait (en prenant ultérieurement comme base de calcul l'absorption spécifique du pigment que l'analyse aura montré très prépondérant, ou une valeur moyenne interpolée d'après la composition

du mélange), et enfin met éventuellement en évidence les stérols qui, bien souvent, les accompagnent.

Cette solution est ensuite concentrée jusqu'à un petit volume sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif, à une température n'excédant pas 40° C, et placée une nuit au congélateur : s'ils sont assez abondants, les stérols précipitent en majeure partie, et sont alors éliminés par filtration (ou centrifugation).

2.2.2. - Saponification. Cette opération doit autant que possible être évitée, ou tout au moins retardée, car elle provoque souvent une altération partielle (par stéréoisomérisation ou oxydation) de certains caroténoïdes ; d'autre part, effectuée sur l'extrait brut, elle interdit de savoir sous quelle forme les xanthophylles qu'il contient sont présentes in natura. Elle est toutefois nécessaire - outre bien entendu pour mettre en évidence les fonctions esters de certains caroténoïdes - chaque fois que les chromatographies sont perturbées par de trop grandes quantités d'impuretés lipidiques.

La saponification est réalisée par la potasse (généralement 5 % de KOH dans le mélange éther éthylique-méthanol 1:3 en volumes), à la température ambiante pendant 4 heures le plus souvent (403). On ajoute alors de l'eau jusqu'à démixion, les caroténoïdes se retrouvant dans l'épiphase. La première hypophase est éventuellement extraite à nouveau par l'éther ; si elle contient des pigments alors nettement hypophasiques (acides), ceux-ci sont recueillis dans une nouvelle fraction étherée après addition d'acide acétique, et se voient ainsi isolés (49).

2.2.3. - Fractionnement. Il est réalisé essentiellement par chromatographie d'adsorption. Il a longtemps été d'usage courant, avant d'effectuer cette opération, de partager les caroténoïdes selon leur solubilité, en pigments épi- et hypophasiques (36). La grande souplesse d'emploi de la chromatographie préparative rend cette première manipulation inutile, sauf dans le cas où l'extrait global contient une xanthophylle extrêmement polaire, - et corrélativement relativement très hypophasique -, dont l'élution quantitative des adsorbants usuels est difficile : sa solubilité très particulière permet alors de

l'extraire aisément. C'est ainsi que les pigments à caractère acide (torularhodine, astacine) sont avantageusement séparés du mélange initial, avant toute chromatographie, par extraction au méthanol alcalin aqueux.

Divers adsorbants ont été envisagés pour la chromatographie des caroténoïdes (94, 62, 36, 140) . Le plus couramment utilisé actuellement est l'alumine, plus ou moins désactivée (selon la standardisation de Brockman et Schodder) par hydratation, selon la polarité des molécules à séparer, le degré d'activité II étant le plus usuel ; la manipulation en est extrêmement commode, alors que la magnésie, qui donne une séparation peut-être quelque peu plus fine (36) se présente sous une forme presque colloïdale, nécessitant l'addition de terre de diatomées qui facilite la filtration.

Bien vertical, le tube à chromatographie, de taille en rapport avec la quantité de substances à séparer, est rempli d'éther de pétrole. Par dessus un léger tampon de laine de verre, l'alumine est versée très progressivement et régulièrement, pour que tout l'air s'en échappe et qu'elle se dépose de façon aussi homogène que possible. On peut aussi mettre au préalable l'alumine en suspension dans l'éther de pétrole en ampoule à décanter (l'air en est ainsi plus sûrement éliminé) et faire s'écouler dans le tube à chromatographie la pâte obtenue au repos. Dans tous les cas, il est bon de tapoter l'appareillage au cours de cette préparation, pour assurer la régularité du dépôt de l'adsorbant. Celui-ci, bien tassé, est surmonté d'une couche de 1 à 2 cm d'épaisseur d'une poudre sans propriétés adsorbantes (sable de mer par exemple), afin de protéger la surface de l'alumine de tout remous lorsqu'on y versera la solution à analyser ou le solvant, et d'assurer un front de départ parfaitement régulier à la chromatographie.

Ramenée à un faible volume (suffisant cependant pour ne pas risquer la cristallisation ou la précipitation de l'un ou l'autre des solutés) la solution éthéro-pétrolique est déposée au sommet de la colonne adsorbante, puis de l'éther de pétrole est versé, assurant la percolation de la solution initiale à travers l'alumine ; les différents caroténoïdes, plus ou moins retenus, se séparent sous forme de bandes ou de zones diversement colorées. Le chromatogramme ainsi développé, les différentes fractions sont successivement éluées par augmentation progressive de la "force" de la phase mobile : éther de pétrole

graduellement enrichi d'éther éthylique, puis d'acétone ; ensuite, ce dernier solvant risquant de déshydrater l'alumine et donc d'augmenter sa force d'adsorption, benzène additionné si nécessaire d'une proportion croissante de méthanol. Pour des pigments extrêmement polaires, il peut être nécessaire de faire intervenir l'acide acétique ou le méthanol alcalin. Du fait de la coloration des composés étudiés, le comportement des différentes fractions s'observe aisément, permettant d'augmenter la polarité de la phase mobile selon le déroulement de la chromatographie, par paliers successifs, façon d'opérer ici plus souple et plus commode que l'utilisation d'un gradient d'élution (36) ; de même, il est assez facile de recueillir séparément les différentes fractions à leur sortie de colonne, en isolant au besoin des intermédiaires quand s'écoule la zone de chevauchement de deux bandes différentes. L'utilisation d'un collecteur automatique de fractions, beaucoup plus rigide, n'a pas ici en général grand intérêt.

On peut aussi extruder séparément les différentes zones quand, leur élution étant trop lente, les risques d'altération des pigments au contact de l'alumine l'emportent sur les progrès de leur séparation qu'apporterait un prolongement de la chromatographie.

Si l'écoulement du solvant doit être accéléré, il est très préférable de le faire à l'aide d'une surpression à la partie supérieure du tube chromatographique (grâce à une colonne de solvant, voire à de l'azote sous pression) que par aspiration à la partie inférieure, cette dernière pratique brisant l'homogénéité de l'adsorbant.

2.2.4. - Caractérisation des fractions isolées.

2.2.4.1. - Spectrophotométrie. Le spectre UV-visible de chaque fraction ainsi isolée permet, dans une certaine mesure, d'apprécier sa pureté par comparaison avec ceux de produits de référence, ou plus généralement de déceler les mélanges d'après les anomalies de leur profil spectral. Mais, surtout, le composé s'étant par ailleurs révélé pur, son spectre apporte, comme nous l'avons vu, qualitativement, une riche information sur sa structure et, s'il recoupe le comportement chromatographique, fournit un indice de tout premier plan pour son identification ; quantitativement, la teneur en caroténoïde présent est déterminée comme nous l'avons indiqué plus haut, en prenant comme absorption

spécifique celle du pigment auquel la fraction a été identifiée (ou, à défaut, une valeur interpolée d'après sa structure présumée, ou une valeur arbitraire moyenne, généralement $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$). Les quantités ainsi calculées fournissent l'importance relative des divers caroténoïdes ; les teneurs absolues sont obtenues en rapportant ces proportions à l'absorption de l'extrait global, du fait des pertes et rétentions en cours d'analyse.

2.2.4.2. - Chromatographie analytique. Elle permet d'établir la pureté d'une fraction et de déterminer assez exactement sa polarité, précisant l'apport du comportement lors de la chromatographie préparative ; enfin, si l'on dispose du produit de référence ⁽¹⁾, de le comparer au composé naturel par cochromatographie. Nous avons utilisé dans ce domaine deux systèmes chromatographiques différents :

a) Le gel de silice sous forme de couche mince, selon
le processus décrit en détail dans la version française de l'ouvrage de RANDERHART (129) : L'adsorbant utilisé est le gel de silice G Merck, le solvant variant avec la polarité de la fraction étudiée et le but poursuivi : les carotènes les moins polaires sont séparés par l'éther de pétrole (Eb. 40-60° C), les hydrocarbures dans leur ensemble et les pigments de même polarité par le mélange, en volumes égaux, de benzène et d'éther de pétrole (Eb. 90-110° C) (36), par l'éther de pétrole (Eb. 40-60° C) enrichi de 2 % d'acétone (132), ou par le solvant undécane-chlorure de méthylène (80-20) (139), les xanthophylles par le chlorure de méthylène contenant 20 % d'acétate d'éthyle (139) ou par l'éther de pétrole (Eb. 40-60° C) additionné de 20 % d'acétone (43), tandis que tous les caroténoïdes migrent et se séparent avec comme phase mobile le mélange benzène-éther éthylique-méthanol (85-10-5) (144) ; ce dernier système est donc particulièrement intéressant pour "l'exploration" préliminaire d'un extrait naturel.

(1) - Nous remercions Monsieur le Docteur K. EGGER (Privat-Dozent à l'Institut de Botanique de l'Université d'Heidelberg) et Messieurs les Docteurs O. ISLER et H. THOMMEN (Ets Hoffmann - La Roche, Bâle) qui nous ont procuré des échantillons de caroténoïdes de référence, dérivés cétoniques du β -carotène en particulier.

b) Le papier filtre enrichi d'adsorbant minéral.

Si l'idée en est déjà ancienne, elle n'a connu une large application que depuis moins d'une dizaine d'années (93) . Cette technique, oeuvre de l'école norvégienne des JENSEN (93, 103, 92) , se caractérise par un pouvoir de résolution incomparablement élevé, une facilité et une rapidité exceptionnelles d'exécution, une reproductibilité et un rendement quantitatif, rarement atteints dans ce domaine. Etant encore assez peu connue, bien qu'extrêmement fructueuse, nous la décrivons avec quelque détail.

Le mode de développement choisi a été la chromatographie circulaire selon RUTTER (131) , méthode qui, toutes choses égales d'ailleurs, donne la meilleure résolution (92) ; en effet, le solvant diffuse simultanément non seulement dans la direction de migration des substances à séparer, mais aussi tangentiellement : les zones qui s'individualisent sont donc étirées transversalement et ne se superposent pas, même quand leur différence de comportement est minime. Un tel mode de migration restreint évidemment le chromatogramme à une seule dimension, mais la technique bidimensionnelle, plus longue et imposant une phase intermédiaire de séchage, est de peu d'intérêt dans le cas de pigments aussi labiles que les caroténoïdes (92, 36) .

On utilise des disques de papier filtre, de 18 cm de diamètre par exemple. Une languette radiale, d'environ 2 mm. de largeur, y est découpée presque jusqu'au centre ; sa longueur ramenée à environ 2 cm., elle est inclinée perpendiculairement à la surface du papier, et servira à alimenter le chromatogramme en solvant. La solution à analyser est déposée progressivement au centre du disque, un courant d'azote assurant l'évaporation rapide du solvant ; la tache, aussi petite que possible, ne doit pas excéder 1 cm. de diamètre. Ce dépôt terminé, quelques gouttes d'acétone, appliquées à son contact à l'extrémité centrale de la languette, l'amènent à former un étroit arc de cercle : les zones qui se séparent au développement sont ainsi plus fines et plus régulières. Pour une cochromatographie, la partie utile du disque de papier est divisée en trois parties égales par deux incisions radiales supplémentaires, s'arrêtant à quelques millimètres du centre ; la substance à étudier est déposée, comme précédemment, au sommet de l'un des secteurs latéraux ainsi définis, le composé témoin de l'autre côté et les deux,

en mélange, dans la portion centrale.

Le disque de papier est alors disposé entre deux couvercles identiques de boîte de Pétri, l'inférieur étant rempli à peu près aux trois quarts par le solvant où plonge la languette précitée. Le développement, effectué à l'abri de la lumière, est achevé en 10 - 20 minutes. Il peut être prolongé pour la séparation de pigments de bas R_f , le solvant s'évaporant par la surface de papier à l'extérieur de la boîte de Pétri (chromatographie à front perdu).

En manipulant avec soin, et en utilisant du solvant frais pour chaque chromatographie, les valeurs R_f sont reproductibles à $\pm 0,01$ près (93), à condition toutefois que le développement ne soit pas perturbé par de trop grandes quantités d'impuretés lipidiques, et pour un lot donné de papier.

Dans une manipulation préparative, les différentes bandes sont découpées immédiatement après leur séparation, pour réduire autant que possible l'altération des pigments, tassées fortement au fond de fins tubes de verre effilés à une extrémité, et éluées par l'acétone : les pigments déposés sont récupérés avec un rendement atteignant 98 à 100 % (93).

Le système adsorbant-éluant utilisé est, pour tous les pigments de polarité supérieure ou égale à celle du β -carotène, le papier Schleicher et Schüll n° 287, contenant 20 % de Kieselguhr, la phase mobile étant l'éther de pétrole (Eb. 40-60° C) enrichi éventuellement d'un pourcentage d'acétone en rapport avec la polarité des pigments à séparer (93). Du papier filtre contenant de l'alumine (S & S n° 667 ou 288), adsorbant plus fort - et légèrement basique - a été utilisé avec succès pour la séparation de caroténoïdes de polarité comprise entre celles du β -carotène et du phytofluène (93) ; elle a pu être appliquée également à l'étude de caroténoïdes plus polaires, en augmentant le pouvoir éluant de la phase mobile, les séparations obtenues étant même quelque peu meilleures, en particulier pour les isomères hydroxylés, qu'avec le papier au Kieselguhr (93). Celui-ci toutefois, beaucoup moins onéreux et de manipulation plus commode, reste l'adsorbant usuel, les deux systèmes se complétant fructueusement pour les comparaisons par cochromatographie.

Le pouvoir de résolution du système est remarquable, comme le montre la très bonne séparation des différents stéréoisomères d'un même pigment (93) . Aussi, bien qu'il y soit parfaitement apte, est-il moins utilisé pour la séparation d'un mélange complexe de caroténoïdes en grands groupes de même polarité (93) que pour l'analyse très fine, quantitative comme qualitative, d'une fraction de polarité donnée, l'étude cinétique d'une réaction caractéristique (93, 9) , la détermination précise de la polarité d'un composé, tous rôles où il est actuellement irremplaçable. Dans le cas de très petits échantillons, la chromatographie analytique de l'extrait global, si possible avant et après saponification, éventuellement en présence de substances de référence, apporte des renseignements semi-quantitatifs et, nous le verrons, souvent concluants du point de vue qualitatif, au moins pour les pigments majeurs.

2.2.4.3. - Coefficient de partage. Nous avons vu plus haut l'apport de sa mesure à l'élucidation structurale d'un caroténoïde.

2.2.4.4. - Reactions caractéristiques. Dans le domaine de la chimie des caroténoïdes elles ont connu, au cours de la dernière décennie, un développement parallèle à celui des techniques spectrales, car, non seulement elles peuvent en confirmer et même en compléter l'apport, mais elles sont à même de fournir des résultats presque aussi concluants (grâce au pouvoir de résolution de la chromatographie et de la spectrophotométrie) sans avoir, et de loin, des exigences aussi poussées de quantité et de pureté. Nous nous contenterons d'évoquer seulement celles que nous avons eu directement l'occasion d'utiliser.

a) L'acétylation, actuellement réalisée par l'anhydride acétique en milieu pyridinique, ne substitue que les hydroxyles primaires et secondaires. Leur nombre peut être déterminé par la différence de polarité ou d'hydrophilie entre la xanthophylle naturelle et son dérivé peracétylé, ou par mise en évidence des différents intermédiaires de la réaction, grâce à l'analyse chromatographique périodique d'ali-quotes du milieu réactionnel.

b) La silylation (114) est positive également avec

les hydroxyles tertiaires, fournissant donc un indice positif de leur présence, qui n'était auparavant mise en évidence que d'une façon négative par le résidu d'hydrophilie du produit d'acétylation du caroténoïde naturel.

c) La réduction par l'hydrure de lithium-aluminium (105) des groupements carbonyles des caroténoïdes conduit à un composé plus polaire dont le spectre visible est celui du carotène parent. Cette réaction ouvre en outre la voie à celles, évoquées ci-dessus, de caractérisation de hydroxyles.

2.2.4.5. - Détermination. Il est raisonnable, lors de la détermination de la structure d'un caroténoïde, de prendre comme hypothèse de travail qu'il s'agit d'une molécule possédant le squelette classique, en C_{40} , des pigments de cette famille, bien qu'un certain nombre d'exceptions naturelles soient connues : apocaroténoïdes d'une part, caroténoïdes bactériens dits en C_{50} d'autre part. Une chromatographie de partage suivant EGGER (couche mince de cellulose imprégnée de triglycéride/ acétone et méthanol aqueux) (42), très sensible à la longueur de la chaîne hydrocarbonée de la molécule, permettrait d'ailleurs de s'en assurer éventuellement.

Le spectre d'absorption dans le visible fournit, on l'a vu, des indications très précises sur le chromophore. Dans le cas d'un composé carbonylé, le spectre du produit de réduction indique le système polyénique présent, l'effet hypsochrome à la réduction donne une idée du nombre de carbonyles ayant réagi (ce que précisera la variation de polarité et d'hydrophilie). Le comportement chromatographique (sur la colonne préparative puis, d'une façon plus précise, en processus analytique) indique la polarité de la molécule, le coefficient de partage, son hydrophilie. La confrontation de ces résultats à ceux de l'étude du spectre permet de conclure à l'éventuelle présence de groupements hydroxylés (ou carboxyles, ceux-ci reconnaissables à l'acidité de la molécule qui les porte), et d'en appréhender le nombre ; confirmation est obtenue par acétylation puis, le cas échéant, silylation.

Dans le cas de pigments déjà connue, ces seuls renseignements conduisent aisément à leur identification. Il est bien évident, toute-

fois, que le critère le plus décisif est la comparaison directe avec le composé de référence, par cochromatographie sur couche mince, ou sur papier selon la technique du disque trois fois divisé, autant que possible dans plusieurs systèmes différents. Pour accroître encore la valeur significative d'une telle comparaison, il est souhaitable de confronter, non seulement les composés eux-mêmes, mais les mélanges de stéréoisomères auxquels ils donnent naissance dans des conditions identiques, et tous les produits homologues que l'un et l'autre fournissent au cours de telle ou telle réaction caractéristique.

CHAPITRE III

=====

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

=====

1. - LEVURES ANASCOSPOREES.

Sporidiobolus johnsonii Nyland.

Les pigments sont extraits par l'acétone puis le méthanol ; la solution éthéro-pétrolique est concentrée et portée au congélateur : les stérols précipitent et sont éliminés par filtration. La teneur en caroténoïdes totaux s'élève à 0,014 % du poids sec (49).

La solution éthéro-pétrolique est affrontée à du méthanol à 90 % contenant 5 % de potasse, ce qui sépare les pigments acides éventuellement présents (hypophasiques) des carotènes proprement dits (épi-phasiques).

Après saponification, les pigments de l'épiphas sont séparés par chromatographie sur colonne d'alumine II en trois constituants : β -carotène, γ -carotène et torulène, la pureté et l'identité des fractions étant déterminées par spectrophotométrie et (co-)chromatographies sur papier Schleicher & Schüll n° 287 et 288.

L'hypophas de Sp. johnsonii se montre parfaitement identique à celle de Rhodotorula sanniei aussi bien par le spectre d'absorption dans le visible (correspondant à un mélange de stéréo-isomères de la torularhodine) que par cochromatographies sur papier S & S 287 (solvant : de 10 à 20 % d'acétone dans l'éther de pétrole) comme sur couche mince de gel de silice G (solvant : 2 % de méthanol dans le benzène).

Au total, la proportion des différents pigments s'établit comme suit :

0,014 %	{	β -carotène	: 31 %
		γ -carotène	: 6 %
		Torulène	: 20 %
		Torularhodine	: 43 %

Rhodotorula sanniei (Cif. et Red.) Lodder.

Il s'agit là de la souche analysée antérieurement par TCHANG (143) et que nous avons cultivée pour nous fournir en témoins des

pigments des levures rouges : torulène et torularhodine.

Dans nos conditions culturales, la teneur en caroténoïdes totaux s'élève à 0,047 % du poids sec, les différents pigments se répartissant comme suit :

0,047 %	{	β -carotène	: 16,6 %
		γ -carotène	: 4,2 %
		Torulène	: 44 %
		Torularhodine	: 35,2 %

Il faut noter que TCHANG, en culture sur milieu gélosé il est vrai (eau de touraillons plus 10 % de saccharose), obtenait une teneur totale en caroténoïdes égale à 2,9 % du poids sec, la torularhodine représentant 99,4 % de la pigmentation. Devant de telles valeurs, on peut se demander (comme l'a implicitement fait GOODWIN (59)) si une erreur de 10 ne s'est pas glissée dans la détermination quantitative de ce dernier pigment ; les chiffres obtenus en opérant une telle correction restent d'ailleurs, aussi bien en ce qui concerne la concentration totale en caroténoïdes que la teneur en torularhodine très supérieurs à ceux que nous avons obtenus. Ces différences pourraient aussi s'expliquer en partie, soit par une évolution de la souche au cours des multiples repiquages qu'elle a subi pendant la trentaine d'années qui ont séparé ces deux analyses, soit par les différences de milieu de développement.

Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison.

La souche étudiée (LY 422) a été isolée par M. le Professeur BOIDIN ; nous avons rassemblé tous les tubes d'assimilation, les cultures sur milieux liquide et solide... utilisés pour sa détermination (20), l'ensemble nous fournissant moins d'un gramme de matière sèche.

Le spectre global (459, 487, 530 nm, et dans l'ultraviolet les pics de l'ergostérol avec D.O. 282 / D.O. 487 = 6) indique, en prenant comme base de calcul l'absorption spécifique de la torularhodine, une teneur en pigments égale à ca. 0,36 % du poids sec.

Nous signalons cette analyse seulement pour indiquer que, après des fractions assimilées d'après leur comportement chromatographique et spectral respectivement au β -carotène et au γ -carotène, et avant le torulène et la torularhodine (majeure), une fraction rose a

été éluée (par 10 % d'éther éthylique, de l'alumine II), de spectre 460, 491, 528 nm. Son étude n'a pas été poursuivie, mais des résultats obtenus ultérieurement sur d'autres espèces nous amènent à penser qu'il puisse s'agir d'un ester de la torularhodine, partiellement isomérisé.

0,36 %	{	β -carotène	: 12 %
		γ -carotène	: 7 %
		Torulène	: 3 %
		Torularhodine	: 68 %
		"P 491"(ester ?) <u>ca.</u>	: 10 %

Rhodotorula aurantiaca (Saito) Lodder.

Après PETERSON et al. (126), HASEGAWA et al. (72) ont remarqué que, si les Levures caroténogènes dans leur ensemble se laissent subdiviser, d'après la longueur d'onde du maximum d'absorption dans le visible de la solution éthéro-pétrolique qu'elles fournissent, en Flavotorula (jaunes, λ_{Max} 450 nm.) et Rubrotorula (rouges ou roses, λ_{Max} 480 nm.), Rhodotorula aurantiaca - comme sa couleur orangée pouvait peut-être le laisser prévoir - se singularise par un maximum d'absorption situé à 470 nm. PETERSON et al. (126) ont trouvé que cette espèce (cultivée sur milieu synthétique liquide agité) accumulait des caroténoïdes au taux de 0,011 % de son poids sec ; à côté de β -carotène (6,2 % des caroténoïdes totaux) et de γ -carotène (9 %), 84,8 % de sa pigmentation est le fait d'un composé qu'ils considèrent comme proche du torulène, mais en différant quelque peu par ses propriétés spectrales et sa plus grande solubilité dans le méthanol.

8 litres de milieu de culture nous ont fourni 6,35 g. de levures (poids sec). L'épiphase obtenue à l'extraction présente un spectre assez émoussé avec maximums à 444, 469 et 500 nm. Sur la base $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 469 nm = 3000, on calcule une teneur en caroténoïdes totaux égale à 0,021 % du poids sec.

A l'analyse (après une saponification énergique nécessitée par la présence de très importantes quantités de lipides), outre le β - et le γ -carotène en faible teneur, est élué (de la colonne d'alumine II par 10 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole) un pigment dont le spectre dans l'hexane présente un profil évoquant un caroténoïde

monocyclique, avec pics à 448, 475 et 501 nm. Son coefficient de partage entre l'éther de pétrole et le méthanol à 95 % est de 99 : 1. Il nous est difficile, au vu de ces données, d'avancer une hypothèse quant à la structure de ce composé ; son spectre apparaît intermédiaire entre ceux du γ -carotène et du torulène. Nous avons vu qu'il a été isolé après saponification : l'hypothèse d'un ester semble pouvoir être écartée ; d'après les données de PETRACEK ET ZECHMEISTER (127), son coefficient de partage pourrait être celui d'un rétro-carotène ou d'un éther. Signalons enfin que l'hydrure de lithium-aluminium n'entraîne aucune modification spectrale de ce composé

0,021 %	{	β - et γ -carotène	: traces
		"P 475"	: majeur

2. - HETEROBASIDIOMYCETES.

2.1. - Ustilaginales.

Ustilago scabiosae (Sow.) Wint.

La souche étudiée provient du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 177 - 42) et est conservée au Laboratoire sous la référence LY 5815. 81. de milieu de culture nous ont fourni 14,4 g. de microorganismes (poids sec). Les pigments extraits par l'acétone se montrent épiphasiques ; le spectre de la solution éthéro-pétrolique ainsi obtenue est très semblable à celui du β -carotène. Calculée d'après le coefficient d'absorption de celui-ci, la teneur en caroténoïdes de U. scabiosae, dans nos conditions culturales, est de 0,0094 % du poids sec.

La chromatographie sur colonne d'alumine II permet de séparer :

- une fraction jaune-orangé très importante, éluee par l'éther de pétrole. Son spectre est celui du β -carotène, dont elle ne peut être séparée en cochromatographies sur papier S & S 287 et 288. Cette fraction représente 88 % du total des caroténoïdes présents.

- deux bandes orangées extrêmement proches, éluees ensemble par 5 - 10 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole. Le spectre et le comportement en cochromatographie (sur papier S & S 287) avec du γ -carotène témoin amènent à penser qu'il s'agit de ce

dernier pigment, partiellement isomérisé, et représentant quelque 7 % de la pigmentation.

- quatre bandes jaune ou jaune-orangé, extrêmement mineures, dont la trop faible importance n'a pas permis l'étude ultérieure

0,0094 %	{	β -carotène	: 88 %
		γ -carotène	: 7 %
		4 pigments	: 5 %

Ustilago zea.e (D.C.) Cda.

(CBS 44563 = LY 5824)

11,03 g. de matériel biologique (poids sec) sont entièrement épuisés par l'acétone ; la solution éthéro-pétrolique obtenue présente, dans le visible, le spectre du β -carotène ; sur la base de l'absorption spécifique de celui-ci, la teneur en caroténoïdes totaux s'élève ici à 0,0034 % du poids sec.

Après saponification, une chromatographie analytique sur papier S & S 287 utilisant comme phase mobile l'éther de pétrole (Eb. 40 - 60° C) montre une bande jaune-orangé très majeure (R_f 0,92), une bande orangée (R_f 0,76 : γ -carotène ?) et une légère bande rose (R_f 0,57 : lycopène ?). Sur colonne, est d'abord éluee par l'éther de pétrole une très importante fraction jaune-orangé, représentant au moins 90 % du total de la pigmentation : son spectre est celui du β -carotène, dont elle ne se sépare pas en cochromatographie. Au-dessus d'individualisent une bande orangée, éluee par 10 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole, une bande jaune et une bande rose que déplace le mélange éther de pétrole : éther éthylique 1 : 1; ces fractions, en trop faible teneur, n'ont pu être étudiées.

0,0034 %	{	β -carotène	90 %
		γ -carotène	?
		lycopène	? traces
		1 pigment ?	

2.2. - Auriculariales.

Auricularia auriculajudae Lin. ex Fr.

Le spectre de l'épiphase obtenue révèle seulement une très légère contamination chlorophyllienne de l'échantillon.

2.3. - Tremellales.

Guepinia helvelloides D.C. ex Fr.

Comme l'a noté TURIAN (147), la coloration de cette espèce n'est pas le fait de caroténoïdes : le pigment qui en est extrait est fortement hypophasique et présente, dans le visible, une bande d'absorption très arrondie autour de 440 nm (dans l'éthanol).

2.4. - Calocérales.

Calocera viscosa Fr. ex. Pers.

TURIAN (147) a caractérisé dans ce champignon du β -carotène, pigment majeur, et un hydroxy β -carotène que, par ses caractères de solubilité, il assimilait à la cryptoxanthine. Entre les deux, une bande rouge, très mineure, s'était individualisée, en teneur trop faible pour permettre son étude ; se basant sur sa couleur et son comportement chromatographique, cet auteur inclinait à voir là du lycopène.

Sauf en ce qui concerne ce dernier pigment, nos résultats recourent ces données. Le spectre de l'extrait global est celui du β -carotène ; sur cette identification est calculée une teneur en caroténoïdes totaux de 0,0037 % du poids sec. De l'ergostérol est également présent (D.O. 282 / D.O. 450 = 4).

La chromatographie sur colonne permet de séparer :

- une fraction majeure, éluee par l'éther de pétrole ; son spectre est celui du β -carotène, représentant 75 % du total des caroténoïdes. Sa rechromatographie montre cependant, à l'état de traces, des bandes très mineures, jaunes, présentant le spectre du β -carotène, mais se révélant plus polaires que le γ -carotène en chromatographie sur papier (esters d'hydroxy β -carotène ?) et une fraction rouge, en quantité trop faible pour être étudiée ;

- deux fractions jaunes, éluees respectivement par 5 et 10 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole, trop peu importantes pour que leur étude puisse être entreprise ;

- une fraction jaune, éluee par 15 % d'acétone dans l'éther de pétrole et possédant le spectre du β -carotène ; elle se révèle hétérogène en chromatographie sur papier S & S 287 mais sa

composante majeure présente des R_f de 0,25 (solvant : éther de pétrole) et 0,67 (1 % d'acétone) correspondant assez bien aux valeurs de la littérature pour la cryptoxanthine (respectivement 0,29 et 0,62) ; teneur : ca. 5 % des caroténoïdes .

0,0037 % $\left\{ \begin{array}{ll} \beta\text{-carotène} & : 75 \% \\ \text{cryptoxanthine (?) } \underline{\text{ca.}} & : 5 \% \\ \text{Plusieurs pigments} & : \text{traces.} \end{array} \right.$

Dacryopinax spatularia (Schw.) Martin.

Les carpophores analysés ont été récoltés en République Centre Africaine par M. le Professeur BOIDIN. L'acétone en extrait la pigmentation, qui se montre épiphasique, la solution ainsi obtenue présentant un spectre très proche de celui du β -carotène. D'après l'absorption de ce pigment, la teneur en caroténoïdes de ce champignon est de 0,023 % de son poids sec.

La chromatographie sur colonne permet de séparer :

- du β -carotène, représentant 49 % du total des caroténoïdes ;
- du γ -carotène (16 %) ;
- une fraction présentant le spectre du β -carotène, éluee par le mélange éther éthylique : éther de pétrole 3 / 1. Sa contamination par des impuretés incolores est extrêmement importante, empêchant de déterminer précisément par chromatographie analytique sa polarité, qui semble proche de celle du lycopène. Après saponification, deux bandes se séparent en chromatographie sur papier, de même couleur et dont les R_f (0,6 et 0,08 avec 2 % d'acétone dans l'éther de pétrole, 0,7 et 0,24 avec 5 %) supportent l'hypothèse d'un mono- et d'un dihydroxy β -carotène (cryptoxanthine 0,62, zéaxanthine 0,09 et 0,3 respectivement). Sur chromatogramme, ces deux pigments apparaissent dans le rapport de 2 (pour le moins polaire) à 1, soit ca.-24 et 11 % des caroténoïdes totaux.

0,023 % $\left\{ \begin{array}{lll} \beta\text{-carotène} & : 49 \% \\ \gamma\text{-carotène} & : 16 \% \\ \text{Hydroxy-}\beta & \underline{\text{ca.}} & 24 \% \text{ (mono-)} \\ \text{carotènes} & \underline{\text{ca.}} & 11 \% \text{ (di-)} \end{array} \right.$ comme esters.

Femsjonia luteo-alba Fr.

La couleur jaune de la solution éthéro-pétrolique obtenue correspond seulement au flanc dans le visible d'une absorption notable dans l'ultra-violet.

3. - GASTEROMYCETES.

3.1. - Lycoperdaceés.

Scleroderma aurantium Vail.

La pigmentation jaune de ce champignon se montre strictement hypophasique ; sa couleur correspond au flanc d'une très intense absorption dans l'ultra-violet, avec une légère inflexion à 392 nm (dans l'acétone).

3.2. - Phallacées.

Anthurus aseroiformis Mc Alp.

Le caroténoïde majeur de la fructification étoilée de ce champignon, cristallisé dans le cytoplasme de ses cellules, a été identifié par EAGLE (41) et TURIAN (146) au lycopène. Le spectre de l'extrait brut est, de fait, très proche de celui de ce pigment ; sur la base de son absorption spécifique, la teneur en caroténoïdes totaux se révèle être de 0,42 % du poids sec. La chromatographie permet de séparer du neurosporène et du lycopène (dans le rapport 1 à 4), dont l'identification a été vérifiée par cochromatographie (sur papier S & S 287) avec les composés de référence.

0,42 %	{	Lycopène	ca.	80 %
		Neurosporène	ca.	20 %

4. - HYMENOMYCETES.

4.1. - Hydnés.

Hydnum repandum Lin. ex Fr. et H. repandum var. rufescens Pers.

Dans l'un et l'autre cas, la coloration jaune extraite par l'acétone se révèle strictement hypophasique, l'éther de pétrole présentant seulement, dans l'ultra-violet, le spectre d'absorption de l'ergostérol.

4.2. - Corticisés.

Phlebia radiata Fr.

La coloration orangée de cette espèce n'est pas le fait de caroténoïdes : les légères inflexions que présente, dans la région du visible où absorbent ces pigments, le spectre de la solution éthéro-pétrolique obtenue, correspondent à une légère contamination chlorophyllienne de l'échantillon.

Hymenochaete mougeotii (Fr.) Massee.

La coloration brune (en solution concentrée) que ce champignon libère dans l'acétone se révèle strictement hypophasique. Le spectre global présente - compte non tenu des pigments chlorophylliens contaminants - une inflexion à 392 nm dans l'acétone, 400 nm dans la pyridine. Les pics de l'ergostérol ne sont pas reconnaissables dans le spectre de l'épiphasie.

Aleurodiscus amorphus (Pers.) Rabenh. ex Schroet.

En dépit de la brillante coloration orangée de ce champignon, le spectre visible de la solution éthéro-pétrolique qu'il nous a fournie peut être attribué à l'inévitable contamination chlorophyllienne de l'espèce. Dans l'ultra-violet par contre, se reconnaissent les pics de l'ergostérol.

Peniophora aurantiaca (Bres.) Hoehn. et Litsh.

La localisation cytologique des pigments de ce champignon (gouttelettes orangées disséminées dans le cytoplasme) donnait à penser qu'il s'agissait de caroténoïdes, en teneur relativement importante ; la relative abondance de cette espèce la rendait par ailleurs particulièrement favorable à l'étude de ses pigments. Les échantillons proviennent de Samoëns (Haute-Savoie), où ils ont été récoltés en Septembre 1965 et 1966, chaque lot ayant fait l'objet de plusieurs analyses.

L'acétone extrait du champignon la totalité de ses pigments, qui se montrent entièrement épiphasiques. Le spectre de l'extrait global présente un maximum à 452 nm et une nette inflexion à 474 nm ; dans l'ultra-violet se reconnaissent les pics de l'ergostérol. Sur la base $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 452 nm = 2300, la quantité de caroténoïdes est estimée à 0,037 % du poids sec.

L'expérience ayant montré (8), d'une part une très importante contamination lipidique, d'autre part la présence de pigments très fortement adsorbés par l'alumine, plusieurs processus analytiques ont été utilisés :

1) - saponification de l'extrait global, ou des différentes fractions après leur isolement ;

2) - fractionnement de l'extrait global soit directement par chromatographie sur alumine (plus ou moins désactivée par hydratation : 3 % d'eau - activité II, comme dans le cas général - ou 12 % d'eau - activité IV à V), soit par séparation des pigments selon leur solubilité (par affrontements successifs de la solution méthanolique de saponification à l'éther de pétrole puis à l'éther éthylique, ou par partage entre l'éther de pétrole et le méthanol à 90 %, ou par séparation à contre-courant entre l'éther de pétrole et le méthanol à 95 %). Les différentes fractions sont ensuite chromatographiées sur un adsorbant en rapport avec leur polarité (8).

Nous avons également conduit des analyses qualitatives de l'extrait global par chromatographie sur couche mince, avant et après saponification, en présence de substances témoins. Ces diverses expériences ont donné des résultats pleinement concordants.

Six pigments ont été isolés :

- du β -carotène (élué de l'alumine II par 5 % d'éther éthylique) représentant 26 % des pigments totaux ;

- du γ -carotène (éluant : 10 % d'éther éthylique) : 2 %. L'identification de ces 2 pigments a été vérifiée par cochromatographie avec les composés de référence sur couche mince de gel de silice (8) et sur papier S & S 287 ;

- un pigment jaune, λ_{Max} 404, 426, 450 nm dans l'éther de pétrole, élué par 15 % d'éther éthylique ; en l'absence de composés de référence, et en raison de sa très faible teneur (1 % du total des caroténoïdes sur la base arbitraire de $E_{1\text{cm}}^1\% = 2500$ à 426 nm) il ne nous a pas été possible de pousser plus loin la caractérisation de ce pigment dont, du fait de la légère contamination chlorophyllienne du matériel, l'origine fongique n'est d'ailleurs pas certaine ;

- de l'échinénone (élue par 20 % d'éther éthylique) représentant 18 % des caroténoïdes présents ; son identification a été vérifiée par cochromatographies avec le produit synthétique sur papier S & S 287 (solvant : 1 % d'acétone dans l'éther de pétrole) et sur couche mince de gel de silice (solvant : benzène 85, éther 10, méthanol 5).;

- un pigment dont le spectre est très proche de celui de la canthaxanthine, mais qui se montre légèrement moins hydrophile (coefficient de partage : 56 : 44 contre 50 : 50) et moins polaire, se séparant nettement en cochromatographies de la canthaxanthine témoin ; teneur (sur la base de l'absorption spécifique de ce dernier pigment) : 15 % du total ;

- de l'astaxanthine, identifiée après saponification par cochromatographie avec l'astacine témoin ; teneur : 35 % des caroténoïdes.

0,037 %	{	β -carotène	: 26 %
		γ -carotène	: 2 %
		"P 426"	: 1 %
		Echinénone	: 18 %
		Di (?) céto- β -carotène	: 15 %
		Astaxanthine	: 35 %

Peniophora quercina (Pers. ex Fr.) Cooke.

Ce champignon se révèle caroténogène; le spectre global présente, il est vrai, sur le flanc d'une intense absorption dans l'ultra-violet (où se reconnaissent, sous forme d'inflexions, les pics de l'ergostérol) à côté d'épaulements dans la région d'absorption des caroténoïdes (452 et 470 nm), des pics traduisant une contamination chlorophyllienne relativement importante ; celle-ci est confirmée par l'absorption à 670 nm mais le rapport des absorptions dans le bleu et le rouge montre que la majeure partie des caroténoïdes présents est d'origine fongique. Sur la base $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 452 nm = 2300, la teneur en caroténoïdes totaux s'élève à 0,003 % du poids du champignon (déduction faite de la contamination).

Deux analyses ont été effectuées, par chromatographie sur colonne d'alumine, la première d'activité II, la seconde plus fortement

désactivée (12 % d'eau) pour faciliter l'élution des xanthophylles les plus polaires ; les résultats qualitatifs étant identiques, nous retiendrons les valeurs quantitatives de la seconde.

Sont séparés et identifiés :

- du β -carotène (identifié par cochromatographie sur papier S & S 287), représentant 34,3 % du total des caroténoïdes présents ;
- de l'échinénone (identifié par cochromatographies, avant et après saponification, sur papier S & S 287 et sur couche mince de gel de silice) ; 3,2 % ;
- de l'astaxanthine (inséparable, après saponification, de l'astacine témoin) : 62,5 %.

Au vu de ces résultats, on peut se demander si la couleur violette de ce champignon est due à la superposition des caroténoïdes et de pigments d'autre nature, ou à la présence de l'astaxanthine sous une forme liée, comme dans la carapace de certains Crustacés.

0,003 %	{	β -carotène	: 34,3 %
		Echinénone	: 3,2 %
		Astaxanthine	: 62,5 %

Peniophora hydnoidea (Pers. ex Fr.) Donk.

Le spectre de l'extract brut de ce champignon, aussi bien dans le visible que dans l'ultra-violet, est très semblable à celui fourni par P. quercina. Deux fractions sont séparées : du β -carotène et, au moins deux fois plus abondant, un pigment rouge très fortement retenu par l'alumine, hypophasique et présentant, dans le visible, un spectre arrondi avec un seul maximum d'absorption autour de 470 nm dans l'hexane. D'après ces propriétés, et les résultats des analyses d'autres espèces de Peniophora, nous pouvons identifier ce second pigment à l'astaxanthine.

{	β -carotène	: <u>ca.</u> 30 %
	Astaxanthine	: <u>ca.</u> 70 %

4.3. - Clavaires.

Pistillaria micans Fr. (1).

Cinq petites boîtes de Pétri ($\emptyset = 10$ cm.) contenant du milieu au malt-agar sont ensemencées avec cette espèce et placées à 25° C (étuve vitrée). Au bout de quinze jours, des pustules rose-pourpre apparaissent tout autour de la bouture ; cette couleur évolue pour donner une teinte fauve allant en s'atténuant progressivement jusqu'à disparaître. Le mycélium et les conidies ont été prélevés ici au stade où la pigmentation était rose-pourpre : à l'aide d'une spatule, le champignon est décollé de son support et transféré dans l'acétone. Cette opération entraîne inévitablement de la gélase, interdisant de déterminer le poids sec du matériel analysé.

L'acétone entraîne la totalité de la coloration, qui passe entièrement dans l'éther de pétrole. Cette épiphase est évaporée à sec et reprise par l'hexane "UV" ; cette solution présente, dans le visible, une nette inflexion à 473 nm, un pic médian à 499 nm et un pic secondaire à 533 nm. Spectre et solubilité concourent à indiquer qu'il s'agit là de caroténoïdes. Dans l'ultra-violet se reconnaît le spectre de l'ergostérol, avec une absorption une dizaine de fois plus intense que celle des pigments.

Chromatographie :

- Deux bandes jaunes-orangé, ténues et diffuses, sont éluées par de 5 à 15 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole. La trop faible teneur de ces deux pigments n'en a pas permis l'étude ; comportement chromatographique et couleur donnent à penser qu'il s'agit, sans doute, des β -et γ -carotènes.

- Une bande violette, virant au pourpre au cours de sa migration, est éluee par 30 % d'éther éthylique. Le spectre de cette fraction présente trois pics à 470, 496, 529 nm. La position des maxima d'absorption et le profil du spectre ne corresponderaient pour nous à aucun pigment connu lors de cette analyse ; les résultats obtenus ultérieurement par N. ARPIN et S. LIAAEN JENSEN (11) sur Cookeina sulcipes nous ont amené à penser depuis qu'il pouvait s'agir là d'un ester de la torularhodine.

(1) - Nous remercions M. J. BERTHIER, Maître-Assistant, qui nous a prêté les cultures de cette espèce.

- Au sommet de la colonne reste fortement adsorbée une importante bande rouge, dont ni l'éther éthylique, ni l'acétone, ni l'éthanol ne provoquent l'élution ; par contre, l'addition de 2 % d'acide acétique à ce dernier solvant, ou le méthanol alcalin, conduisent à un déplacement partiel de la coloration. Le spectre dans l'hexane ressemble par son profil à celui de la fraction précédente, c'est-à-dire à celui d'un caroténoïde monocyclique ; les pics se situent à 466, 492, 526 nm. Les résultats que nous avons ensuite obtenus lors de l'analyse de Levures rouges nous ont amené à penser qu'il s'agit ici de torularhodine, partiellement isomérisée au cours des processus d'analyse.

{ β - et γ -carotènes(?)	: traces
{ Ester de la torularhodine	majeure
{ Torularhodine	

Clavaria helicoides Pat. et Dem. var. robusta Corner (1)

L'acétone extrait de ce champignon la plus grande partie de sa coloration, qui se révèle quasi-totalement épiphasique. La solution éthéro-pétrolique obtenue présente, dans le visible, des pics à 425, 449 et 476 nm et dans l'ultra-violet le spectre de l'ergostérol (D.O. 282 / D.O. 449 = 1,5). Sur la base arbitraire de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$ au maximum d'absorption, la teneur en caroténoïdes totaux est de 0,033 % du poids sec.

La chromatographie sur colonne d'alumine II permet de séparer :

- une fraction jaune-orangé, très importante ; son spectre et son comportement chromatographique (élution par 5 % d'éther éthylique dans l'éther de pétrole) conduisent à l'identifier au β -carotène, ce qui est vérifié par cochromatographie (sur papier S & S 287) avec le composé de référence ; le β -carotène représente 80 % des pigments présents dans la solution éthéro-pétrolique.

- une petite fraction pourpre, éluee par 50 % d'éther éthylique. Son spectre (λ_M (470, 494, 522 nm avec un profil de caroténoïde monocyclique) et sa polarité ($R_f = 0,32$ sur papier S & S 287, solvant 2 % d'acétone dans l'éther de pétrole) militent en faveur

(1) - Nous remercions M. J. BERTHIER qui a déterminé cette espèce, nouvelle pour l'Afrique.

de son rapprochement avec le déhydro-3,4 torulène (489,5, 519,5 nm, $R_f = 0,35$). Ce pigment (sur la base $E_{1cm}^{1\%} = 3000$ à 492 nm) représente 1,5 % du total des caroténoïdes.

- une fraction rose, éluee par 5 % d'acétone dans l'éther de pétrole. Le spectre révèle son hétérogénéité, mais les pics qui prédominent sont ceux d'un autre caroténoïde monocyclique, la déhydro-2' plactaniaxanthine (10) ; la cochromatographie avec ce composé confirme cette identification. Teneur : environ 2 % des caroténoïdes présents.

- enfin, deux bandes jaunes sont éluees respectivement par 10 et 20 % d'acétone ; leur spectre et leur polarité indiquent qu'il s'agit vraisemblablement d'hydroxy- β -carotènes. Etant donné leur assez faible teneur, et la contamination chlorophyllienne de l'échantillon, leur origine fongique n'est pas assurée ; l'étude de ces dernières fractions n'a pas été poursuivie.

0,033 %	{	β -carotène	: ≥ 80 %
		Déhydro-3,4-torulène (?)	: 1,5 %
		Déhydro-2' plactaniaxanthine:	2 %
		Hydroxy- β -carotène (?)	: <u>ca.</u> 10 %

Neurophyllum sp.

Cette espèce, récoltée comme la précédente en République Centre Africaine par M. le Professeur BOIDIN, nous a fourni une épiphase présentant seulement les pics d'absorption de l'ergostérol.

Clavaria sans caroténoïdes.

Nous regroupons ici, pour la clarté de l'exposé, les espèces de Clavaria (au sens ancien et le plus large du terme) où la recherche de caroténoïdes s'est révélée négative.

Il s'agit de Cl. pallida B. & C.

Cl. corniculata Schoef. ex Fr.

Cl. aurea Schoef. ex Fr.

Cl. formosa Pers. ex Fr.

Cl. fistulosa Fr.

Cl. truncata Q.

Cl. pistillaris Lin. ex Fr.

Dans tous les cas, la coloration jaunâtre extraite par l'éthanol correspond seulement au flanc d'une absorption dans l'ultra-violet, avec une légère inflexion à 340 nm pour Cl. pallida et Cl. corniculata, 390 nm pour Cl. aurea et Cl. formosa. Cette matière colorante, dont l'extraction est poursuivie à l'acétone, se montre strictement hypophasique, l'éther de pétrole présentant seulement, dans tous les cas, les pics d'absorption de l'ergostérol.

4.4. - Cantharellacées.

Cantharellus konradii (R. Maire) Kühn.-Romagn.

L'extrait acétonique de ce champignon est saponifié ; l'épiphase obtenue présente seulement, sur le flanc une absorption très intense dans l'ultra-violet plus lointain, des pics à 282, 292, 303 et 319 nm qui évoquent des composés incolores extraits de C. cornucopioides et C. tubaeformis.

Cantharellus cornucopioides (Fr. ex Lin.) Kühn.-Romagn.

TURIAN (147) n'ayant trouvé aucun caroténoïde dans la proche C. cinereus, nous avons été surpris par la coloration de l'épiphase, présentant dans le visible le spectre d'un mélange de neurosporene et de lycopène ; toutefois, la teneur en caroténoïdes de cette espèce est seulement de 0,0006 % de son poids sec. Le spectre global présente en outre, dans l'ultra-violet, des pics à 280, 300 et 315 nm.

L'abondance des contaminants lipidiques ayant rendu nécessaire une saponification, les deux phases obtenues à la démixion arrêtant cette réaction sont étudiées séparément.

L'hypophase, colorée en orangé-rouge, présente des pics d'absorption dans l'ultra-violet seulement, à 276, 287, 300, 315 nm, la coloration observée correspondant seulement au flanc, dans le visible de cette absorption. Après acidification par l'acide acétique, la coloration vire au jaune-verdâtre et se montre principalement épiphasique ; les pics d'absorption dans l'ultra-violet (en solution dans l'hexane) sont les mêmes que précédemment, le changement de couleur observé correspondant seulement à un changement de pente du spectre à l'approche du visible.

L'épiphase présente, dans l'ultra-violet, les pics de

TABLEAU XIII : Propriétés chromatographiques des caroténoïdes de Cantharellus tubaeformis (51) .

Fraction	Eluant		Gel G			Valeurs R _f sur :				
	sur	Al ₂ O ₃ II	0%*	0%**	2%***	0%†	2%*	5%*	10%*	15%*
1	Ether de pétrole	0,1	0,32							
2	Ether de pétrole		0,25	0,84						
3	5 % +		0,24	0,84						
4	15 % +		0,18	0,80		0,89				
5	3 % *			0,72		0,48				
6	15 % *			0,10						
7	5 % de méthanol dans benzène			0,0		0,08	0,30 (1)	0,60 (2)	0,89	

+ Ether éthylique dans éther de pétrole (Eb. 40-60° C) (1) 0,98 après silylation

* Acétone dans éther de pétrole (Eb. 40-60° C) (2) Zéaxanthine : 0,56

** Acétone dans éther de pétrole (Eb. 100-120° C)

TABLEAU XIV : Propriétés spectrales et distribution des caroténoïdes
de Cantharellus tubaeformis (51).

Fraction	λ max nm.	(E.P.)	Identification	% caroténoïdes totaux
1	331 348 361		Phytofluène	1,4
2	409 432 461		<u>cis</u> -Neurosporène	2
3	378 400 425		β -carotène	1,6
4	415 439 468		Neurosporène	72,0
5	445 472 503		Lycopène	8,8
6	398 420 446		?	1
7	378 400 425		DiOH- β -carotène	13,2

l'ergostérol, et dans le visible, les pics à 416, 440, 470 et 500 nm. Son analyse est conduite, qualitativement, par cochromatographie sur papier en présence de composés témoins, montrant qu'elle se compose de neurosporène et de lycopène ; semi-quantitativement, la détermination spectroscopique de l'absorption des deux pigments après leur élution du chromatogramme et le calcul basé sur le rapport des hauteurs des pics dans le spectre global concourent à indiquer que neurosporène et lycopène sont présents dans le rapport 3 / 2.

0,0006 %	{	Neurosporène	:	<u>ca.</u>	60 %
		Lycopène	:	<u>ca.</u>	40 %

Cantharellus tubaeformis Fr.

La première analyse du contenu caroténoïdique de cette espèce fut entreprise en 1937 par WILLSTAEDT (162) ; cet auteur isola du lycopène et un pigment majeur qu'il assimila au 8'-apo- β -caroténal. En 1960, TURIAN (147) montra que ce dernier pigment était en fait du neurosporène, et mit en évidence, de plus, un "oxycaroténoïde mineur".

Le spectre global est très proche de celui du neurosporène ; d'après l'absorption spécifique de celui-ci, la teneur en caroténoïdes totaux s'élève à 0,02 % du poids sec (51).

Après 12 heures de saponification, nécessitée par la présence d'importantes quantités de lipides, la fraction insaponifiable est extraite par l'éther de pétrole et concentrée sous pression réduite : apparaît alors un important précipité blanc d'ergostérol, éliminé par filtration.

Lors de la chromatographie sur colonne d'alumine II, sept fractions sont successivement éluées ; leurs propriétés sont indiquées dans les tableaux ci-joints, ainsi que l'identification qui en est déduite. La fraction 2 présente deux pics secondaires à 318 et 329 nm ($E_{329}/E_{432} = 0,45$) dans l'éther de pétrole : c'est le double cis-pic des caroténoïdes aliphatiques (166) ; l'identification des fractions 4 et 5 a été vérifiée par cochromatographie avec les composés de référence ; la fraction 6, mineure et contaminée par de très importantes quantités d'ergostérol, n'a pu être davantage étudiée : son spectre semble traduire un chromophore (ca. 8 doubles liaisons conjuguées) aliphatique, l'adsorption milite en faveur d'un dérivé mono-hydroxylé.

Le spectre de la fraction 7 est parfaitement identique à celui du ζ -carotène. Les propriétés chromatographiques et de partage (coefficients de 32 : 68, 54 : 46, 86 : 14 entre l'hexane et le méthanol à 95, 90, 85 %) sont en faveur d'un dihydroxycaroténoïde à courte chaîne polyénique conjuguée ; l'acétylation se montre négative, la silylation positive, indiquant la nature tertiaire de ces hydroxyles. On propose donc pour ce pigment la structure du dihydroxy-1,1' tétrahydro-1, 2, 1', 2' ζ -carotène, la substitution en 1 paraissant beaucoup plus vraisemblable qu'en 5. Il s'agit là d'un nouveau composé naturel (51).

Signalons enfin que, avec la première fraction, a été élué un composé incolore dont le spectre présente trois pics très accusés à 287, 300, 315 nm dans l'éther de pétrole, semblable donc à celui d'un composé non caroténoïdique (stéroïdè?) extrait comme on vient de le voir de C. cornucopioides.

Cantharellus lutescens (Pers.) Kühn.-Romagn.

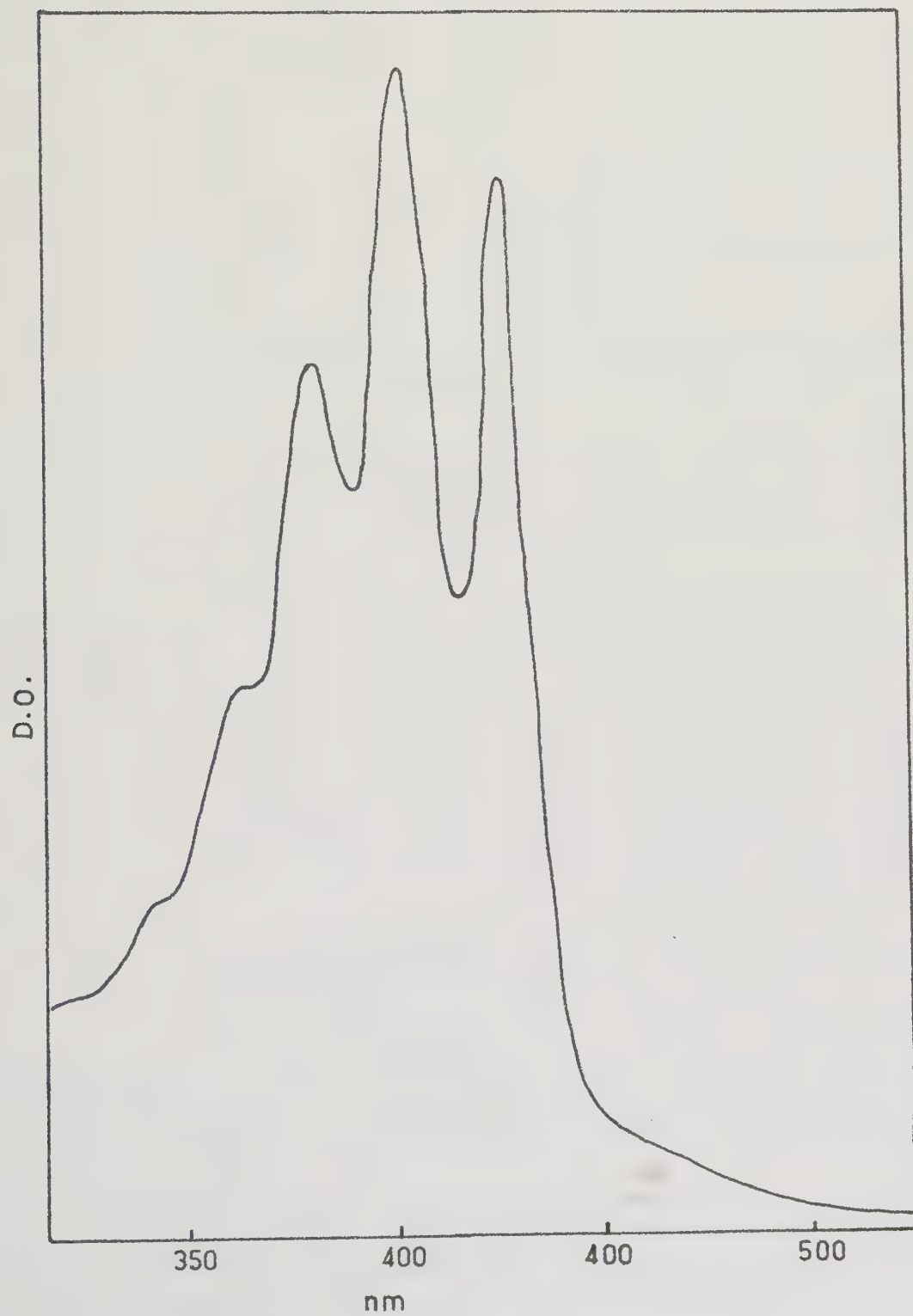
L'analyse d'un petit échantillon de cette espèce nous a permis d'identifier du neurosporène, représentant ca. 45 % des caroténoïdes totaux, du lycopène - 50 % - conformément aux résultats antérieurs (162) (147), et deux fractions mineures vraisemblablement identiques aux deux derniers pigments de C. tubaeformis.

{	Neurosporène :	<u>ca.</u> 45 %
	Lycopène :	<u>ca.</u> 50 %
	2 pigments :	<u>ca.</u> 5 %

Cantharellus friesii Q.

L'échantillon est traité par l'acétone jusqu'à obtention d'un extrait incolore ; le résidu d'extraction reste légèrement fauve. La solution éthéro-pétrolique est saponifiée une nuit, et les deux phases qui se séparent à l'arrêt de cette réaction sont étudiées séparément.

La phase hyd.-méthanolique alcaline est colorée en orangé-roux par des composés strictement hypophasiques dans ces conditions, épiphasiques (et jaunes) après acidification. Le spectre (dans l'éther éthylique, après plusieurs rinçages à l'eau pour éliminer l'acide acétique) présente, sur le flanc d'une absorption beaucoup plus intense dans l'ultra-violet plus lointain, un épaulement à 281 nm et un pic à 317 nm.



L'épiphase présente, dans l'ultra-violet, les pics de l'ergostérol et dans le visible des pics à (425), 448 et 475 nm. Par chromatographie sont séparés :

- du β -carotène ;
- un pigment de spectre proche de celui de l'échinone, mais de coefficient de partage 86 : 14 (au lieu de 93 : 7) ;
- un pigment saumon, présentant le spectre de la canthaxanthine mais un coefficient de partage de 55 : 45 (au lieu de 50 : 50), et rappelant donc un pigment mineur de Peniophora aurantiaca.

Cantharellus cibarius Fr. variété amethystinus Q.

Si le type de cette espèce a montré à WILLSTAEDT (162) une assez riche caroténogénèse où prédomine le β -carotène, cette variété nous a donné une épiphase incolore, présentant seulement, sous forme d'épaulements, les pics de l'ergostérol. Cette variété diffère donc du type, non seulement par le développement des pigments autres que les caroténoïdes, mais par la disparition de ceux-ci.

4.5. - Agaricales.

Omphalia chrysophylla Fr.

Il était particulièrement intéressant d'étudier la pigmentation de cette Agaricale que de nombreux caractères rapprochent des Chanterelles (97). La chromatographie sur colonne d'alumine II sépare (50) :

- du β -carotène (représentant 87 % du total des caroténoïdes)
- du γ -carotène (11 %)
- du lycopène (0,5 %)
- du torulène (1,5 %)

dont l'identification a été vérifiée par cochromatographie (sur papier S & S 287) avec les composés de références avant et après saponification.

Omphalia abiegna Bk.-Br.

L'épiphase obtenue à partir de cette espèce est incolore ; seules, sur le flanc d'une très importante absorption dans l'ultra-violet, des inflexions correspondant aux pics de l'ergostérol peuvent être reconnues.

Phyllotopsis nidulans (Fr. ex Pers.) Gilb.-Donk.

Cette Agaricale est caroténogène : l'épiphase présente, dans le visible, des pics à (428), 454 et 500 nm ; sur la base d'un $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ moyen de 2500 à 454 nm, les caroténoïdes représentent 0,028 % du poids sec de ce champignon. L'ergostérol est également présent (D.O. 282 / D.O. 454 ~~ne~~ 11).

La chromatographie sur alumine II sépare :

- du β -carotène (représentant 58 % des caroténoïdes totaux),
- du γ -carotène (29 %),
- du neurosporène (0,5 %),

l'identification des ces fractions étant vérifiée par cochromatographies (sur papier S & S 287) avec les pigments de référence,

- de l'échinénone (8 %), identifiée d'après son spectre, qui, après traitement du pigment par l'hydrure de lithium-aluminium, donne celui du β -carotène ; cette fraction se montre contaminée par de petites quantités d'un pigment de même couleur que la canthaxanthine, mais nettement moins polaire en cochromatographie sur papier, rappelant donc un composé mineur de Peniophora aurantiaca et peut-être de Cantharellus friesii,

- une fraction impure, éluee par 20 % d'acétone dans l'éther de pétrole et présentant sensiblement le spectre du β -carotène : il s'agit vraisemblablement d'un dérivé hydroxylé de celui-ci ; teneur : ca. 1 %,

- de l'astaxanthine (3,5% du total après extrusion de la colonne, certainement plus dans le champignon, du fait des pertes particulièrement importantes au cours de son isolement), identifiée d'après son comportement chromatographique et son spectre, qui par réduction du pigment donne celui du β -carotène, et cochromatographie (sur gel de silice G) avec l'astacine témoin après saponification.

0,028 %	{	β -carotène	: 58 %
		γ -carotène	: 29 %
		Neurosporène	: 0,5 %
		Echinénone	: 8 %
		Hydroxy- β -carotène(?)	: 1 %
		Astaxanthine	: 3,5 %

Clitocybe venustissima (Fr.) Sacc.

Une première analyse de ce champignon (5) a montré que sa pigmentation est entièrement le fait de caroténoïdes, qui représentent 0,17 % de son poids sec. Ont été séparés :

- du β -carotène (représentant 8 % des caroténoïdes totaux)

- du γ -carotène (ca. 75 %)

l'identification de ces deux pigments, basée sur leur spectre et leur comportement chromatographique, étant confirmée par cochromatographie sur couche mince de gel de silice G (solvant : 2 % d'acétone dans l'éther de pétrole Eb. 100 - 120° C) avec les produits synthétiques.

Au-dessus du γ -carotène, deux bandes rose et jaune très pâles ont été observées, dont la très faible teneur n'a pas permis l'étude.

Une seconde analyse, sur un échantillon encore moins important, a été effectuée par cochromatographies (sur papier 3 & S 287) de l'extrait global, avant et après saponification, avec les composés de référence. Elle a entièrement confirmé les résultats de la première et a en outre permis d'identifier la bande rose mineure au lycopène.

0,17 %	{	β -carotène	: 8 %
		γ -carotène	: <u>ca.</u> 75 %
		- 2 pigments dont lycopène	: <u>ca.</u> 17 %

Clitocybe dealbata Fr. ex Sow.

Le spectre de l'épiphase présente seulement les pics spécifiques de l'ergostérol.

Hygrophorus puniceus Fr.

Le spectre dans le visible de l'extrait acétonique de ce champignon présente un pic d'absorption très large et très arrondi autour de 416 nm, avec de légers épaulements à 455 et 480 nm. Cette coloration se révèle strictement hypophasique, l'épiphase montrant seulement les pics d'absorption de l'ergostérol.

Peromyces sp.

Cette espèce (provenant de République Centre Africaine), brillamment orangée, ne livre à l'acétone qu'une coloration jaune pâle épiphase. Le spectre global, dans l'éther de pétrole, présente, sur le flanc d'une très intense absorption dans l'ultra-violet, de légers

pics à 322, 338, 382, 405 et (434) nm.

Des expériences de solubilité préférentielle ont alors été tentées, dans les conditions de mesure du coefficient de partage. Nous indiquons ci-dessous le spectre des différentes fractions obtenues, en signalant à partir de quelle longueur d'onde les mesures ont été effectuées, tous ces pics se situant sur le flanc d'une très intense absorption ultraviolette :

Ether de pétrole	/	Méthanol à 95 %
(320; 323, 338, 385, <u>408</u> , 433 ;		(270 : 295, 309, <u>329</u> , (338), (408).
(DO : 0,2)		(DO : 1,2)
E.P.	/	MeOH 95 % + 10 % de KOH
(300 : 326; 345, <u>364</u> , 383, (408)(433);		(270 : 292, <u>339</u> , 355.
(DO : 1)		(DO : 0,7)
E.P.	/	MeOH - KOH précédent + acidification
(300 : 326, (345), <u>363</u> , 383, (408)(433);		(300 : 323, 340, 363
(DO : 0,35)		(DO : 0,35)
E.P.	/	MeOH acidifié par HCl
(320 : 322, <u>362</u> , 384, 405, (432) ;		(260 : 363
(DO : 0,4)		(DO : 0,2)

De telles variations d'absorption spectrale et de solubilité en fonction du pH impliquent pour ces pigments une nature non caroténoïdique. Une chromatographie sur colonne d'alumine II a néanmoins été tentée. L'éther de pétrole, enrichi progressivement de 10 à 20 % d'éther éthylique, sépare quatre bandes jaunes présentant toutes les mêmes pics d'absorption : 292, 307, 323, 342, 363, 381, (404) et 430 nm, la hauteur relative des différents pics et la finesse du profil spectral variant toutefois d'une fraction à l'autre : le pic à 363 nm est majeur pour les deux premières fractions, puis celui à 323 nm l'emporte, cette zone d'absorption restant bien individualisée par rapport à celle de l'ultraviolet plus lointain. Ceci tend à montrer que, bien que les différentes bandes qui se sont individualisées sur la colonne aient paru séparées d'une façon satisfaisante, nous avons affaire à un mélange dont les proportions varient au cours de l'élution..

De tels résultats, de toute façon, confirment que ces pigments liposolubles jaunes ne sont pas des caroténoïdes.

Lactarius torminosus Fr. ex Schaef.

Du β -carotène ayant été identifié dans le mycélium de cette espèce (91), il était intéressant de procéder à l'analyse de sa fructification. La matière colorante qui en est extraite par l'acétone se montre strictement hypophasique, l'épiphasie présentant seulement les pics d'absorption de l'ergostérol.

Cortinaires violets.

Les pigments responsables de cette coloration sont cytoplasmiques, comme les caroténoïdes ; leur couleur, toutefois, semblait s'opposer à un tel rapprochement. Mais, d'une part, des pigments de cette famille et de couleur pourpre ont été récemment isolés de Champignons (10), et d'autre part la liaison de certains caroténoïdes avec par exemple des protéines peut modifier considérablement leur couleur, comme dans le cas des pigments de certains Crustacés : il était donc intéressant de procéder à l'analyse de représentants de ce groupe. Les espèces suivantes ont été étudiées :

Cortinarius evernius Fr.

C. " " traganus Fr. ex Wienn.

C. " " albo-violaceus Fr. ex Pers.

C. " " caerulescens Schaef.

C. " " praestans Cord.

L'acétone où ont été conservés les échantillons est toujours très trouble ; légèrement jaune-verdâtre pour C. traganus et C. caerulescens, il est à peu près incolore dans les autres cas. Cette coloration, hypophasique, correspond seulement au flanc de l'absorption ultra-violette, sans pic défini dans le visible. Au partage apparaît toujours une émulsion très importante, l'épiphasie présentant seulement, dans tous les cas, le spectre de l'ergostérol. Dans le cas de C. caerulescens, l'hypophasie a été évaporée à sec ; le résidu, coloré en jaune-roux, ne se solubilise ni dans l'éthanol, ni dans l'éther éthylique, ni dans le N, N'-diméthyl formamide, se dissout partiellement dans l'eau (en produisant un trouble), totalement dans l'éthanol à 50 % . A partir de toutes ces espèces, ni l'acétone, ni l'éthanol, ni le méthanol, ni le benzène, ni le N, N'-diméthyl formamide ne se colorent. Seul le méthanol alcalin (méthanol à 95 % contenant 10 % de potasse) entraîne une certaine coloration jaune (flanc de bande ultra-violette), strictement hypophasique. A l'acidifi-

cation (par l'acide acétique), la teinte vire au jaune-verdâtre pâle (traduisant un changement de la pente du spectre), sans que soit modifié son caractère hypophasique.

EN RESUME, les espèces suivantes ne nous ont pas montré de pigments caroténoïdes :

Auricularia auricula-Judae L. ex Fr.
Guepinia helvelloides D.C. ex Fr.
Femsjonia luteo-alba Fr.
Scleroderma aurantium Vail.
Phlebia radata Fr.
Hymenochaete mougeotii (Fr.) Massee
Aleurodiscus amorphus (Pers.) Rabenh. ex Schroet.
Hydnum repandum L. ex Fr. et sa variété rufescens Pers.
Clavaria pallida B. et C.
Cl. corniculata Schaef. ex Fr.
Cl. aurea Schaef. ex Fr.
Cl. formosa Pers. ex Fr.
Cl. truncata Q.
Cl. pistillaris L. ex Fr.
Neurophyllum sp.
Cantharellus konradii (R. Maire) Kühn.-Romagn.
Canth. cibarius Fr. var. amethysteus Q.
Omphalia abiegna Bk.-Br.
Clitocybe dealbata Fr. ex Sow.
Hygrophorus puniceus Fr.
Poromycena sp.
Cortinarius evernius Fr.
Cort. caerulescens Schaef.
Cort. albo-violaceus Fr. ex Pers.
Cort. traganus Fr. ex Weinm.
Cort. praestans Cordier
Lactarius torminosus Fr. ex Schaef.

Cependant que le tableau XV indique le contenu pigmentaire des espèces caroténogènes étudiées.

TABLEAU XV

TABLEAU XV	
<u>Rhodotorula aurantiaca</u> (Saito) Lodder	
<u>Rh. glutinis</u> (Fries.) Harrison	
<u>Rh. sarniei</u> (Cif. et Red.) Lodder	
<u>Sporidiobolus johnsonii</u> Nyland	
<u>Ustilago zea</u> (D.C.) Cda.	
<u>Ust. scabiosae</u> (Sow.) Wint.	
<u>Calocera viscosa</u> Fr. ex Pers.	
<u>Dacryopinax spathularia</u> (Schw.) Martin	
<u>Anthurus aseroiformis</u> Mc Alp.	
<u>Peniophora aurantiaca</u> (Bres.) Hoehn. et Litsch.	
<u>P. quercina</u> (Pers. ex Fr.) Cooke	
<u>P. hydnoïdes</u> (Pers. ex Fr.) Donk	
<u>Pistillaria micans</u> Fr.	
<u>Clavaria helicoides</u> Pat. et Dem. var. <u>robusta</u> Corner	
<u>Cantharellus cornucopioides</u> (Fr. ex L.) Kühn. - Romagn.	
<u>C. tubaeformis</u> Fr.	
<u>C. lutescens</u> (Pers.) Kühn. - Romagn.	
<u>C. friesii</u> Q.	
<u>Omphalia chrysophylla</u> Fr.	
<u>Clitocybe venustissima</u> (Fr.) Sacc.	
<u>Psilocybe cyanopus</u> (Fr. ex Pers.) Gilh. - Donk	
	Dihydroxy- -carotène (VIII)
	Neurosporène (IV)
	Lycopène (V)
	γ -carotène (XVI)
	Torulène (XVII)
	3,4-déhydro torulène
	Torularhodine (XXV)
	2'-déhydro plectanixanthine (XXII)
	β -carotène (XXVII)
	Cryptoxanthine (XXVIII)
	Zéaxanthine (XXIX)
	Echinénone (XXXII)
	Astaxanthine (XLI)
	Céto-(β)-caroténoïdes non identifiés
	Xanthophylles non identifiées
	Caroténoïdes non identifiés.

CHAPITRE IV

=====

DISCUSSION ET CONCLUSION

=====

De par le but même de ces travaux, nos résultats sont dans leur ensemble dispersés de façon trop clairsemée parmi les unités systématiques les plus variées de Basidiomycètes pour offrir matière à discussion générale. A part, sans doute, une tendance particulièrement fréquente à la perte des caroténoïdes, les données ici rassemblées, prises dans leur ensemble, ne font que confirmer le tableau que nous avons brossé, dans l'introduction de ce travail, de la caroténogénèse fongique et de ses particularités. Nous envisagerons seulement ici l'éventuel apport de cette étude à l'éclaircissement des relations taxinomiques et phylétiques dans deux groupes de Champignons :

- Les Levures caroténogènes et leurs relations avec les Hétérobasidiés, Ustilaginales plus précisément.

- Les Hyménomycètes supérieurs, en particulier le problème de la position des Chanterelles comme charnière éventuelle entre les Agaricales et certaines Aphylllophorales.

1. - RELATIONS ENTRE LEVURES CAROTENOGENES ET HETEROBASIDIES.

Nous avons cité plus haut les éléments montrant l'étroite parenté des Levures caroténogènes asporogènes (Rhodotorula) et ballistosporogènes (Sporobolomyces). L'évolution des idées sur la position systématique des Sporobolomycétacées a été résumée par LODDER, SLOOFF et KREGER-VAN RIJ (113). Les Champignons appartenant à cette famille (Sporidiobolus et Bullera, ainsi que Tilletopsis et Itersonilia, ces deux derniers, formant un mycélium vrai, n'étant pas considérés comme de Levures) se caractérisent par l'apparition, sur des cellules apparemment végétatives, d'un stérigmate au sommet duquel se différencie une spore, éjectée ensuite selon un mécanisme semblable à celui de l'émission des basidiospores des Hyménomycètes. Il apparaît donc tentant

d'effectuer un tel rapprochement, en particulier avec les Hétérobasidiés, chez qui la baside se divise en articles donnant naissance chacun à une spore ; la validité de cette façon de voir est essentiellement déterminée par celle de l'identification de la ballistospore à la basidiospore, fondamentalement liée à la reproduction sexuée. C'est pour-quoi ce rattachement des Sporobolomycétacées aux Basidiomycètes ne fut d'abord pas retenu, les spores des premières étant considérées comme des conidies. En effet, les cellules végétatives leur donnant naissance sont uninucléées (contrairement au mycélium secondaire des Basidiomycètes) et aucune caryogamie n'y avait été observée. Cependant, SAINCLIVIER ayant observé (1951) une caryogamie assez fréquente dans des cellules levuriformes de Sporobolomyces, en conclut qu'elle précède régulièrement la formation des spores, appuyant donc l'idée que les Sporobolomycétacées sont des Basidiomycètes. Si bien que c'est à titre d'Hétérobasidié que fut décrit le genre monospécifique Sporidiobolus, extrêmement affine à Sporobolomyces, dont il ne diffère que par production d'un mycélium vrai, bouclé ; et, dans son Traité de Botanique Systématique, CHADEFAUD (27) range les Sporobolomycétacées parmi les Basidiomycètes.

Si nos résultats confirment l'étroite affinité de Sporobolomyces et Sporidiobolus, dont la pigmentation s'est révélée identique, ils n'apportent aucun argument définitif quant à leur position vis-à-vis des Hétérobasidiés. En effet, si les deux Ustilago étudiés sont bien caroténogènes, leur pigmentation à base de β -carotène apparaît "indifférenciée" et, dans nos conditions de culture tout au moins, ne comporte aucun des caroténoïdes (torulène, torularhodine) des levures rouges, dont la présence, recoupant des données d'autre nature, apporterait un très fort indice de parenté entre ces groupes. Rappelons toutefois que LEDERER (101), analysant les caroténoïdes de Puccinia coronifera (récoltée in natura), avait rencontré un pigment acide qu'il rapprochait de la torularhodine qu'il avait lui-même caractérisée chez (Rhodo) Torula. Torulène et torularhodine ont été par ailleurs rencontrés chez divers Discomycètes (26, 107, 11) et la seconde, pensons-nous, chez Pistillaria micans, Clavariacée réduite et se développant sur feuilles mortes (habitat qui n'est pas très éloigné de celui des Sporobolomycétacées).

2. - HYMENOMYCETES.

2.1. - D'une façon générale, la première observation qui s'impose est le caractère dispersé et restreint de la possession de pigments caroténoïdes au sein des divers groupes d'Hyménomycètes ; se sont montrés ici caroténogènes :

- deux champignons clavarioïdes,
- plusieurs espèces cantharelloïdes, centrées particulièrement autour du genre Cantharellus à son sens le plus restreint,
- un genre de Corticiées (Peniophora),
- trois espèces d'Agaricales.

Le cas général, chez les Hyménomycètes, est donc la perte de cette famille de pigments, qui ne s'est conservée - et n'a éventuellement évolué - que dans quelques séries disjointes.

On peut noter par ailleurs que, dans trois genres sans relation directe (Cantharellus, Peniophora, Phyllotopsis) la caroténogénèse conduit à l'accumulation de dérivés cétoniques du β -carotène. Plutôt qu'un caractère ancestral survivant çà et là, nous préférons y voir le résultat de phénomènes de convergence. D'une part, en effet, les caroténoïdes accumulés peuvent être de nature toute différente (torularhodine, déhydro-2' plectanixanthine), mais représentent également des dérivés carbonylés, ici d'un squelette hydrocarboné monocyclique. L'apparition de tels groupements cétones ou carboxyles correspond à une oxydation poussée de la molécule de caroténoïde, oxydation dont nous avons dit plus haut les raisons de penser qu'elle est synonyme d'Evolution, comme le confirme sans cesse l'étude des caroténoïdes des Discomycètes, où le progrès de l'oxydation de ces pigments a pu être mis en parallèle étroit avec l'évolution des caractères macro- et microscopiques (9-11). Le squelette bicyclique du β -carotène, aboutissement normal de la biogénèse des carotènes proprement dits, serait le substrat le plus fréquent de cette oxydation ; une spécialisation particulière conduirait à l'orientation des chaînes réactionnelles dans la voie des caroténoïdes monocycliques. Par ailleurs, la répartition comparée des caroténoïdes au sein des Ascomycètes et des Basidiomycètes amène à attribuer à l'origine commune de ces deux grands Phylums une caroténogénèse "indifférenciée" (β -carotène majeur, δ -carotène, lycopène,

torulène). Or, c'est la pigmentation même de celle des espèces ici étudiées - Omphalia chrysophylla, comme nous l'allons voir - qui apparaît la plus proche d'une "charnière" entre deux groupes (où, par ailleurs, se rencontrent des espèces accumulant des céto- β -caroténoïdes).

2.2. - Genre Peniophora sensu-stricto.

BOIDIN (18,19) a montré combien est naturelle cette coupure. L'analyse des caroténoïdes vient appuyer cette façon de voir puisqu'en dépit de leurs différences de coloration, P. aurantiaca et P. hydnoides d'une part (groupe incarnata), P. quercina d'autre part (groupe cinerea) présentent une caroténogénèse qualitativement très semblable (β -carotène et dérivés cétoniques, dont surtout l'astaxanthine). On peut cependant noter que, quant on passe de P. aurantiaca à P. quercina, la teneur en caroténoïdes est divisée par dix ou presque, cependant que se développent des pigments d'autre nature.

2.3. - Champignons clavarioïdes.

Leur ensemble est défini seulement par leur morphologie macroscopique fort peu différenciée : le caractère artificiel de ce groupe, révélé par la microscopie, n'est donc pas pour surprendre, et CORNER, par exemple, y reconnaît vingt-sept genres (31). Les espèces qui nous intéressent se sont vues ainsi réparties :

Ramaria aurea (Fr.) Quel.

Ramaria formosa (Fr.) Quel.

Nevrophyllum sp.

Ramariopsis Kunzei (Fr.) Donk (= Cl. pallida B. & C.)

Clavulinopsis corniculata (Fr.) Corner

Clavaria helicoïdes Pat. et Démange

Pistillaria micans Fr.

Clavariadelphus fistulosus (Fr.) Corner

Clavariadelphus truncatus (Fr.) Donk

Clavariadelphus pistillaris (Fr.) Donk

CORNER, dans sa révision de l'ensemble des Champignons clavarioïdes (31), basée essentiellement sur la structure et le développement des fructifications, ne définit au-dessus du genre que des "séries" traduisant les affinités qu'il décèle. Ramaria, aux spores ochracées

et ornées, se trouve à part, proche semble-t-il de Gomphus (incl. Nevrophyllum) ; Clavulinopsis et Ramariopsis sont voisins et semblent à rapprocher de Clavaria ; Pistillaria ne serait pas très éloignée de Clavariadelphus, dont les affinités seraient à chercher plutôt du côté de Cantharellus. DONK (40) verse les Ramaria dans les Gomphacées, les autres genres cités se voyant rassemblés dans la famille des Clavariacées, tribu des Clavarioïdées (les Clavariadelphus, selon cet auteur, ne méritant pas d'être rapprochés des Cantharellacées, du fait de la disposition différente des mitoses dans leurs basides - caractère auquel il attache plus d'importance que CORNER, dans ce cas tout au moins -, de leur mode de développement et de la réaction vert sombre qu'ils donnent sous l'action du sulfate ferrique, caractère qui, avec d'autres, les rapprocheraient plutôt des Gomphacées). La coloration des spores par le Bleu coton, observée par PETERSEN (125), vient, sauf sur ce dernier point, appuyer les vues de DONK : les spores de Ramaria (au moins pour les espèces nous intéressant ici) sont effectivement semblables à celles des Gomphus, tandis que se rapprochent celles de Clavaria, Clavulinopsis, Clavariadelphus (et Cantharellus), dans lesquelles le cytoplasme (et non la paroi sporique) se colore, à l'exception des gouttelettes lipidiques qu'il contient. La plus ou moins grande coalescence de ces gouttelettes distingue Clavaria, Cantharellus, et l'ensemble Clavulinopsis-Clavariadelphus.

En ce qui concerne les espèces qui ne sont montrées sans caroténoïdes, on peut remarquer la parenté des spectres des deux Ramaria étudiées (très proches selon CORNER (31)), et celle aussi des spectres du Clavulinopsis et du Ramariopsis, ce qui apparaît comme un élément de plus en faveur de l'étroite affinité de ces deux genres.

Les deux espèces reconnues ici comme caroténogènes, Pistillaria micans et Clavaria helicoïdes, présentent en commun leur orientation, assez exceptionnelle, dans la direction des caroténoïdes monocycliques, réalisant d'ailleurs par là une convergence frappante avec les Sarcoscyphacées (9,-11). Ceci nous paraît un argument assez fort en faveur de leur rapprochement, bien que CORNER place, on l'a vu, ces deux genres dans des séries d'affinités très différentes. Mais il faut remarquer la place quelque peu à part que tient Cl. helicoïdes au sein du genre Clavaria (dont d'autres espèces présentent des pigments rouges

dont la nature demande à être précisée) par ses spores colorées et par les cloisonnements secondaires de ses hyphes et de ses basides âgées ; cependant que CORNER lui-même, à propos d'au moins deux Pistillaria roses (P. montevidensis Speg. et P. rhodocionodes Corner) envisage un rapprochement avec Cl. helicoides.

Il est à noter que, si Clavulinopsis corniculata ne nous a pas montré de caroténoïdes, c'est dans ce genre qu'a été rangée la Clavaire rouge à pigment caroténoïdique décrite par HEIM (83) (Clavaria cardinalis Boud. et Pat. = Clavulinopsis miniata (B.) Corner var. sanguinea Corner) ; de plus, CORNER note que, dans ce genre, la couleur rouge semble être due à des caroténoïdes dissous dans des gouttelettes du cytoplasme. La nature de ces pigments mériterait toutefois d'être vérifiée par l'analyse ; en effet, dans la seule espèce où la nature caroténoïdique du pigment semble bien établie (Cl. miniata) ce sont les hyphes médullaires qui sont les plus colorées : ailleurs, les pigments orangés sont concentrés surtout dans le sous-hyménium. Et surtout si leur localisation cytologique évoque des caroténoïdes, c'est aussi celle du pigment jaune de Cl. corniculata, dont nous avons vu qu'il est de nature différente. De plus, ces pigments, s'ils verdissent bien à l'iode, ne subissent pas de modification par l'acide sulfurique concentré : contrairement à leur position dans la cellule, leur localisation dans le champignon comme certains caractères chimiques semblent donc les éloigner des caroténoïdes (31) .

2.4. - Agaricales.

Il a été longtemps considéré que les Agaricales au sens strict - Chanterelles exclues - ne synthétisaient pas de caroténoïdes (5) . En fait, s'il apparaît que quelques rares espèces sont caroténogènes, ce caractère se montre ici exceptionnel. Si du β -carotène a été signalé dans le mycélium d'un Lactaire (91) , la présence de pigments de cette famille dans leurs fructifications n'est le fait, jusqu'à plus ample informé, que de trois espèces : Phyllotopsis nidulans, Clitocybe venustissima et Omphalia chrysophylla. Notons que SINGER range ces deux dernières espèces dans un même genre Gerronema, avec d'autres (Omphalia xanthophylla par ex.) dont la pigmentation pourrait être de même nature. Mais Phyllotopsis et Gerronema apparaissent

sans relation directe, et cette dispersion de la caroténogénèse, comme son extrême rareté, paraissent lui conférer un caractère de relique, ayant seulement survécu ça et là : dans le cas général, les caroténoïdes ont disparu des Agaricales au profit d'autres pigments, anthraquinoniques par exemple.

2.5. - Champignons cantharelloïdes

Les Chanterelles apparaissent, dès l'abord, comme intermédiaires entre les Agaricales et les Aphylllophorales : ce sont, en effet, des Hyménomycètes à port agaricoïde (pied et chapeau, celui-ci fertile seulement sur sa face inférieure), mais dépourvues de vraies lames, l'hyménium étant tout au plus plissé de veines souvent dichotomes. Cette définition morphologique est évidemment trop large pour cerner un groupe naturel - des Agaricales indiscutables mais régressées s'y inscrivent en effet - et dut être précisée, le critère retenu comme essentiel étant le mode stichobasidié des divisions dans l'hyménium. Ce caractère semble éloigner nettement les Chanterelles des Agaricales, où il est inconnu ; comme elles s'en écartent également dans d'autres domaines (structure de l'hyménium, mode de développement) elles furent souvent exclues de cet ordre, et rangées dans les Aphylllophorales, où divers auteurs leur cherchèrent des affinités. Deux problèmes se posent donc ici : d'une part, celui des relations à l'intérieur du groupe ainsi défini (distinction et degré véritable d'affinité entre Cantharellus et Craterellus) ; d'autre part, celui de la position du groupe pris dans son ensemble, ou tout au moins du genre Cantharellus.

KUHNER et ROMAGNESI (99) , étudiant les Chanterelles européennes, y distinguent tout au plus deux sous-genres d'après la présence (Cantharellus) ou l'absence (Craterellus) de boucles, le second renfermant, parmi les espèces étudiées quant à leur caroténogénèse, C. cornucopioides et C. cinereus. CORNER (32) attribuant une importance primordiale au développement et à la structure des fructifications, et considérant la disposition des faisceaux mitotiques dans les basides comme un caractère secondaire, sépare nettement les Craterellus (restreints aux espèces les plus infudibuliformes) avec C. cornucopioides, des Cantharellus (où C. cinereus est près de C. tubaeformis et C. lutescens), le développement des premiers lui paraissant relativement plus proche

de celui des Clavaires que de celui des Chanterelles vraies. DONK (40) au contraire, accordant dans ce cas une plus grande importance à la disposition ^{des divisions} des basides, les considère comme très proches et réunis dans une même famille des Cantharellacées.

Or, aussi bien par ses pigments caroténoïdes que par des composés d'autre nature, C. cornucopioides se rapproche étroitement, on l'a vu, du groupe C. lutescens - C. tubaeformis, dont il ne diffère de notre point de vue que par une caroténogénèse moins abondante, avec corrélativement un grand développement de pigments sombres d'autre nature. Ces données militent donc très fortement en faveur de l'homogénéité des Cantharellus (ss. Kühner-Romagnesi). En fait, les résultats obtenus conviendraient parfaitement au très proche (morphologiquement) C. cinereus. C'est pourquoi - la question étant d'importance - nous pensons que les résultats ici présentés attendent confirmation. Une cause d'erreur est en effet à craindre au niveau de la détermination, ou plus vraisemblablement de l'hétérogénéité (étant donnée la très faible teneur globale trouvée) du lot soumis à l'analyse. La validité du résultat négatif obtenu par TURIAN (147) pour C. cinereus dépend pour la même raison quelque peu de l'importance de l'échantillon analysé.

On peut par ailleurs noter que CORNER (32) subdivise le genre Cantharellus en plusieurs sous-genres, dont (d'après le port, la présence ou non d'une cavité dans le stipe) Cantharellus (avec C. cibarius, C. cinnabarinus et C. friesii) et Phaeocantharellus (avec C. lutescens et C. tubaeformis) ; or, il est à remarquer que toutes les espèces analysées du premier groupe accumulent toutes des caroténoïdes bicycliques (β -carotène et dérivés cétoniques) et celles du second exclusivement des composés aliphatiques. Au seul vu de l'ordre d'apparition de ces composés au cours de la biogénèse, on serait tenté de considérer comme plus primitives les espèces à caroténoïdes aliphatiques, qui contiennent d'ailleurs des pigments brunâtres d'autre nature, et de postuler à partir d'elles une divergence évolutive conduisant soit à C. cinereus, soit à C. cibarius et de là à C. friesii, avec dans chaque cas perte ou régression de l'un des deux types de pigments initialement présents. Il apparaît cependant bien peu vraisemblable que la voie des caroténoïdes bicyclique, développée chez certaines Chanterelles, y soit une redécouverte ; d'autre part, comme il a déjà été noté à ce propos (147), le neurosporène ne s'accumule, semble-t-il, que lorsque la caroténogénèse

subit une inhibition partielle. Aussi peut-on plutôt penser que c'est à partir de C. cibarius, dont la pigmentation apparaît assez peu différenciée (et dont nous allons voir qu'on la retrouve dans une espèce proche des Chanterelles) que se serait déroulée une évolution, également divergente, et conduisant bien, soit à C. friesii, soit à C. cinereus, mais où le groupe C. tubaeformis - C. lutescens marquerait une étape de la régression des caroténoïdes le long de ce second phylum.

KÜHNER (97), dans la description accompagnant une planche illustrant Omphalia chrysophylla Fr., fait remarquer combien cette indiscutable Agaricale (par son port, ses lames, le mode chiasmatobasidié des divisions dans son hyménium) se rapproche des Chanterelles vraies par (outre sa couleur, son aspect général) sa trame emmêlée, sa sporée et son hyménium mal limité du sous-hyménium. Cependant, l'exclusion des Cantharellacées hors des Agaricales étant généralement considérée comme un fait acquis, ce fut parmi les Aphyllophorales que les Auteurs leur cherchèrent des affinités. CORNER (31, 32) rapproche Cantharellus des grandes Clavaires simples Clavariadelphus : Cl. pistillaris possède l'hyménium veiné des Chanterelles, Cl. truncatus a un sommet tronqué et stérile pouvant ne pas être très éloigné de l'origine ou de la régression d'un chapeau. Selon cet auteur, à part la disposition des divisions des basides -caractère auquel il n'accorde pas grand poids - les deux genres diffèrent seulement par la présence d'un véritable chapeau chez Cantharellus ; mais que Clavariadelphus truncatus acquière une croissance marginale et l'on aura une fructification ressemblant fort à celle de Canth. cuticulatus ; à l'inverse, si Cantharellus perdait sa croissance marginale, le résultat en serait Cl. truncatus. Le sens dans lequel se serait déroulée cette éventuelle évolution reste à préciser. DONK (40) au contraire, accordant une grande importance au caractère chiasmo- ou stichobasidié des basides, éloigne totalement Cantharellus de Clavariadelphus (la similitude morphologique des deux genres ne résultant pour lui que d'un phénomène de convergence), apparentant plutôt le second aux Gomphus. Les vues de PETERSEN se rapprochent davantage de celles de CORNER quant à l'importance à accorder à la disposition des mitoses dans les basides (124), et son étude de la coloration des spores par le bleu coton (125) va totalement à l'encontre de l'opinion de DONK, séparant nettement les Clavariadelphus des Gomphus et les rap-

prochant des Cantharellus (au sein, il est vrai, d'un vaste ensemble comprenant également la série Clavaria-Clavulinopsis).

En fait, il nous paraît que Cantharellus, riche en caroténoïdes, ne peut dériver de Clavariadelphus, dépourvu de ces pigments : si parenté il y a entre ces deux genres, l'évolution se serait faite à partir d'un pré-Cantharellus encore chiasmobasidié (si, comme CORNER (31), BOIDIN (18), PETERSEN (124), on considère le mode de division stichobasidié comme d'apparition secondaire) vers Clavariadelphus. Par contre, l'identité de la pigmentation, les éléments macro- et microscopiques décrits par KÜHNER, l'odeur forment un faisceau de caractères communs à Omphalia chrysophylla et aux Chanterelles tel que ces dernières n'en ont avec aucun autre groupe. Ceci nous amène à penser que c'est autour de cette Omphale qu'il convient de chercher l'origine des Chanterelles (si l'on considère, encore une fois, le caractère stichobasidié comme évolué), Chanterelles dont l'exclusion des Agaricales nous paraît de toute façon excessive. La véritable place, dans cet Ordre, de bien des espèces cantharelloïdes a été reconnue ; il semble en aller de même pour les Chanterelles proprement dites (Cantharellus) qui nous apparaissent comme un diverticule dont l'origine est sans doute très proche du genre Gerronema dont deux espèces se sont déjà montrées, on l'a vu, caroténogènes et qui présente souvent la sporée jaune de bien des Chanterelles.

3. - CONCLUSIONS

Si ce travail ne fournit matière qu'à peu de conclusions définitives, ce fait même se révèle encourageant, car il montre que, dans ce domaine, beaucoup reste à faire, qui serait susceptible d'apporter de fécondes données quant aux propriétés, et par là aux relations, de bien des groupes systématiques. Les Champignons cantharelloïdes, souvent caroténogènes, sont ici évoqués au premier chef, mais aussi, d'un côté, les Agaricales éventuellement affines qui synthétisent les mêmes pigments et, de l'autre côté, les champignons clavarioides. La parenté qui semble exister entre la pigmentation de Pistillaria micans et celle de Clavaria helicoides pose le problème des possibles relations entre ces deux espèces et, corrélativement, des genres qui les renferment, ou celui de la position de Cl. helicoides par rapport aux autres Clavaria rouges (cette couleur est-elle

le fait de caroténoïdes ?). Se pose également la question des Clavaires exotiques à caroténoïdes, cantharelloïdes selon HEIM (14) : une meilleure connaissance de leurs pigments, et d'une façon générale de la répartition des caroténoïdes chez les Clavaires au sens le plus large, apporterait sans nul doute d'intéressants arguments à la discussion des relations, et à l'intérieur du groupe et avec les champignons cantharelloïdes.

Ceci nous amène à évoquer la nécessité, en Mycologie en particulier, de ne pas se restreindre à la seule flore européenne, et le poids de l'étude des espèces exotiques : Cl. helicoides et Cl. cardinalis nous le rappellent ici, et, dans l'étude (taxinomique) des caroténoïdes des Discomycètes, l'analyse d'espèces centre-africaines s'est révélée particulièrement fructueuse (10, 11). Le fait est évidemment général : on connaît l'exemple classique des "ancêtres" européens du cheval, et c'est en Afrique ou en Extrême-Orient que l'Homme va chercher ses origines.

RESUME

=====

Les pigments caroténoïdes ont été recherchés dans une cinquantaine d'espèces de Basidiomycètes appartenant aux groupes les plus divers. Une vingtaine d'entre elles se sont montrées posséder ce type de pigments, et ont fait l'objet d'analyses aussi détaillées que possible. Sur ce nombre, douze d'avaient pas été analysées antérieurement, et, en outre, des informations supplémentaires ont été apportées sur six espèces ayant déjà fait l'objet d'études chimiques. Par ailleurs, une molécule nouvelle a pu être isolée et caractérisée, pour laquelle une hypothèse structurale fondée a été proposée.

Les conclusions générales qui ressortent de cette étude sont celles que l'on peut appliquer à l'ensemble de la caroténogénèse fongique : la pigmentation "initiale" semble comprendre le β -carotène, le lycopène et peut-être déjà le torulène. Aucun mode de substitution ou d'hydroxylation n'a de caractère général, ce qui amène à penser que les xanthophylles "de base" ont disparu avec la photosynthèse ; la réapparition ultérieure de réactions de ce type a pu se faire ainsi plusieurs fois de façon indépendante, aboutissant donc à des résultats divers et souvent différents de ceux plus généraux des Plantes Vertes. Le plus souvent, cependant, la synthèse des caroténoïdes disparaît ; là où elle persiste, elle peut avoir été l'objet d'une évolution assez poussée, se traduisant par l'oxydation du squelette hydrocarboné, quelquefois au stade monocyclique, fait exceptionnel chez les Eucaryotes.

Du point de vue taxinomique, on peut noter : l'homogénéité, le caractère à la fois isolé et évolué du genre Peniophora ss ; la parenté de la pigmentation des deux Champignons clavarioïdes rouges étudiés qui réalisent d'ailleurs un exemple remarquable de convergence avec les Sarcoscyphacées ; le fait que l'absence de caroténoïdes chez Clavariadelphus empêche d'y voir l'origine des Chanterelles (souvent riches en caroténoïdes, dont la distribution à l'intérieur du groupe semble instructive quant à son évolution), Chanterelles qui, au contraire, par ce caractère après d'autres, se rapprochent de Gerronema chrysophyllum, Agaricales dont le genre contient au moins une autre espèce caroténogène, fait exceptionnel dans cet ordre.

BIBLIOGRAPHIE

=====

1. AASEN A.J. et LIAAEN JENSEN S. (1965). Fungal Carotenoids. II. The structure of carotenoid acid Neurosporaxanthin. Acta Chem. Scand., 19, 1843-1853.
2. AASEN A.J. et LIAAEN JENSEN S. (1966). Carotenoids of Flexibacteria. III. The structures of Flexixanthin and Deoxyflexixanthin. Acta Chem. Scand., 20, 1970-1988.
3. AKAKI M. et ISHII R. (1950). The Pigment of Monilia sitophila. J. Ferment. Technol. (Jap.), 28, 63. (C.A. 47 2824).
4. ANDERSON R.F., ARNOLD M., NELSON G.E.N. et CIEGLER A. (1958). Feed supplement production. Microbial production of β -carotene in shaken flasks. J. agric. Food Chem., 6, 543-545.
5. ARPIN N. (1966). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Sur la présence de carotènes chez Clitocybe venustissima (Fr.) Sacc. C.R. Acad. Sc. Paris, 262, 347-349.
6. ARPIN N. Résultats inédits.
7. ARPIN N., FIASSON J.L. et LEBRETON Ph. (1968). Méthodes modernes d'analyse des caroténoïdes (à paraître).
8. ARPIN N., LEBRETON Ph. et FIASSON J.L. (1966). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. II. Les caroténoïdes de Peniophora aurantiaca (Bres.) Hoehn. et Litsch. (Basidiomycètes). Bull. Soc. Myc. Fr., 82, 450-459.
9. ARPIN N. et LIAAEN JENSEN S. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. III. Nouveaux caroténoïdes, notamment sous forme d'esters tertiaires, isolés de Plectania coccinea (Scop. ex Fr.) Fuck. Phytochem., 6, 995-1005.
10. ARPIN N. et LIAAEN JENSEN S. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. IV. Les caroténoïdes de Phillipsia carminea (Pat.) Le Gal ; isolement et identification d'une xanthophylle naturelle nouvelle. Bull. Soc. Chim. Biol. Fr., 49, 527-536.
11. ARPIN N. et LIAAEN JENSEN S. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Sur la présence de l'ester méthylique de la torularhodine chez Cookeina sulcipes (Berk.) Kuntze (Ascomycètes). C.R. Acad. Sc. Paris, 265, 1083-1085.
12. BACHMANN E. (1886). Ber. deut. Bot. Ges., 4, 68 (cité in 94).
13. BARNETT H.L., LILLY V.G. et KRAUSE R.F. (1956). Increased production of carotene by mixed + and - cultures of Choanephora cucurbitarum. Science, USA, 123, 141.
14. BERTOSSI F. et CIFERRI O. (1957). I pigmenti di Rhodotorula rubra i Torulopsis pulcherrima. Nuovi Ann. Ig. Microbiol. Ital., 8, 548-553.

15. BERTRAND G. et POIRAULT G. (1892). C.R. Acad. Sc. Paris, 115, 828 (cité in 94).
16. BEZSSONFF N.A. (1914). C.R. Acad. Sc. Paris, 159, 448 (cité in 123).
17. BOBKOVA T.S. (1965). Sporobolomyces roseus (en russe). Prikl. Biochem. Mikrobiol., 1, 426-432.
18. BOIDIN J. (1958). Essai biotaxinomique sur les Hydnes résupinés et les Corticiés. Rev. Mycol., H.S. 6, 388 p..
19. BOIDIN J. (1965). Le genre Peniophora sensu-stricto en France. Bull. mens. Soc. Linn. Lyon, 34, 161-169 et 213-219.
20. BOIDIN J., ABADIE F., JACOB J.L. et PIGNAL M.C. (1962). Les levures à spores réniformes. Bull. Soc. mycol. Fr., 78, 155-203.
21. BONALY R. et VILLOUTREIX J. (1965). Isolement et identification d'un caroténoïde aldéhydique en C₄₀ dans une levure rouge. C.R. Acad. Sc. Paris, 261, 4904-4905.
22. BONNER J., SANDOVAL A., TANG W. et ZECHMEISTER L. (1946). Changes in polyene synthesis induced by mutation in a red yeast (Rhodotorula rubra). Arch. Biochem., 10, 113-123.
23. BOSE S.R. (1941). Nature of the colouring substances in colored Polyporaceae. Trans. Nat. Inst. Sc. India., 2, 69-85.
24. BÜNNING E. (1938). Planta, 27, 148 (cité in 123).
25. CANTINO E.C. et HYATT M.T. (1953). Carotenoids and oxidative enzymes in the aquatic Phycomycetes Blastocladiella and Rhizophlyctis. Amer. J. Bot., 40, 688-694.
26. CARLILE M.J. et FRIEND J. (1956). Carotenoids and reproduction in Pyronema confluens. Nature (G.B.), 178, 369-370.
27. CHADEFAUD M. (1960), in CHADEFAUD M. et EMBERGER L., Traité de Botanique Systématique, 1, Masson, Paris.
28. CHICHESTER C.O. (1967). The Biosynthesis of Carotenoids. Pure Applied Chem., 2, 215-226.
29. CHU F.S. (1959). Carotenoids found in aecidiospores of Kunkelia nitens. Proc. West Va. Acad. Sc., 31, 33-35.
30. CIEGLER A., ARNOLD M. et ANDERSON R.F. (1959). Microbiological production of carotenoids. IV. Effect of various grains on production of β -carotène by mated strains of Blakeslea trispora. Appl. Microbiol. (U.S.A.), 7, 94-98.
31. CORNER E.J.H. (1950). A Monograph of Clavarioid Fungi. Oxford University Press.
32. CORNER E.J.H. (1966). A Monograph of Cantharelloid Fungi. Oxford University Press.
33. DALE J. (1954). Empirical Relationships of the Minor Bands in the Absorption Spectra of Polyenes. Acta.Chem. Scand., 8, 1235-1256.
34. DALE J. (1957). The Free-Electron Model, "Overtone" Bands and Vibrational Structure in Absorption Spectra of Polyenes and Polyenyne. Acta Chem. Scand., 11, 265-274.

35. DAVIES B.H. (1961). The carotenoids of Rhizophlyctis rosea. Phytochem., 1, 25-29.
36. DAVIES B.H. (1965), Analysis of carotenoids pigments, in GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments, Academic Press, Londres, p. 489-532.
37. DAVIES B.H., JONES D. et GOODWIN T.W. (1963). The problem of Lycopersen formation in Neurospora crassa. Biochem. J., 87, 326-329.
38. DAVIES B.H., VILLOUTREIX J., WILLIAMS R.J.H. et GOODWIN T.W. (1963). The possible role of β -zeacarotene in carotenoid cyclisation. Biochem. J., 89, 96.
39. DAVIS J.B., JACKMAN L.M., SIDONS P.T. et WEEDON B.C.L. (1966). Carotenoids and related compounds. XV. The structure and synthesis of Phytoene, Phytofluene, β -carotene and Neurosporene. J. Chem. Soc., 1966, 2154-2155.
40. DONK M.A. (1964). A conspectus of the families of the Aphyllophorales. Personia, 3, 199-324.
41. EAGLE K. (1950). Über das Pigment von Anthurus aseroiformis MacAlp. Planta, 38, 233-243.
42. EGGER K. (1964). Vergleichende Untersuchung der Xanthophyllveresterung in Blüten, Früchten und Herbstlaub. Ber. deutsch. Bot. Ges., 77, 145-150.
43. EGGER K. (1965). Die Kerocarotinoide in Adonis annua L.. Phytochem., 4, 609-618.
44. EGGER K. (1967). Ketocarotinoidester in Acetabularia mediterranea L.. Phytochem., 6, 611-619.
45. EMERSON R. et FOX D.L. (1940). γ -carotene in the sexual phase of the aquatic fungus Allomyces. Proc. Roy. Soc., 128, 275-293.
46. ENGEL H. et FRIEDERICHSEN I. (1958). Die Carotinoide von Mutinus caninus Huds.. Arch. Mikrobiol., 31, 28-32.
47. ENTSCHEL R. et KARRER P. (1958). Carotinoidsynthesen. XXII. Umsetzungsprodukte des β -carotins mit Bromosuccinimid. Helv. Chim. Acta, 41, 402-413.
48. ENTSCHEL R. et KARRER P. (1959). Carotinoidsynthesen. XXVII. Synthese des Rhodoxanthin, des Retro-dehydro-kryptoxanthin, und über Umwandlungsprodukte des β -carotinons. Helv. Chim. Acta, 42, 466-472.
49. FIASSON J.L. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Les caroténoïdes de Sporidiobolus johnsonii Nyland. C.R. Acad. Sc. Paris, 264, 2744-2745.
50. FIASSON J.L. (1968). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. Les carotènes de Omphalia chrysophylla Fr. C.R. Acad. Sc. Paris, 266, 1379-1381.
51. FIASSON J.L. et ARPIN N. (1967). Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons. V. Sur les caroténoïdes mineurs de Cantharellus tubaeformis Fr.. Bull. Soc. Chim. Biol. Fr., 49, 537-542.

52. FIASSEON J.L., LEBRETON Ph. et ARPIN N. (1968). Les caroténoïdes des Champignons : structure, répartition, utilisation en Systématique. Bull. Soc. Nat. Arch. Ain., 82, 47-67.
53. FINK H. et ZENGER E. (1934). Zur Biochemie des Farbstoffe der roten Hefe. Wochensch. Brau., 51, 129-130.
54. FRIEDERICHSEN I. et ENGEL H. (1957). Beitrage zur Kenntniss des Abschlusrrhythmus und des Farbstoffs von Sphaerobolus stellularis (Thode) Pers.. Planta, 49, 578-587.
55. FRIEDERICHSEN I. et ENGEL H. (1958). Der Farbstoffe von Cordyceps militaris L.. Arch. Mikrobiol., 30, 393-395.
56. FULLER M. et TAVARES J.E. (1960). Isolation and identification of the orange pigment in the fungus Cladochytrium replicatum. Biochim. Biophys. Acta, 44, 589-590.
57. GARDNER E.B. (1949). Elongation of the conidiophore of Aspergillus giganteus in relation to light quality. Amer. J. Bot., 36, 809.
58. GARTON G.A., GOODWIN T.W. and LIJINSKY W. (1951). Studies in carotenogenesis. I. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleeianus Burgeff. Biochem. J., 48, 154-163.
59. GOODWIN T.W. (1952). Studies in carotenogenesis. III. Identification of the minor polyene components of the fungus Phycomyces blakesleeianus and a study of their synthesis under various cultural conditions. Bioch. J., 50, 550-558.
60. GOODWIN T.W. (1952). Fungal carotenoids. Bot. Rev. USA, 18, 291-316.
61. GOODWIN T.W. (1953). Studies in carotenogenesis. VIII. The carotenoids present in the Basidiomycetes Dacromyces stillatus. Bioch. J., 53, 538-540.
62. GOODWIN T.W. (1955). Carotenoids, in PAECH K. et TRACEY M.V., Modern Methods of Plant Analysis, Springer-Verlag, Berlin, p. 272-312.
63. GOODWIN T.W. (1965). Distribution of Carotenoids ; The biosynthesis of Carotenoids, in GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Academic Press, Londres.
64. GOODWIN T.W. (1966. in SWAIN T., Comparative Phytochemistry, Academic Press, Londres.
65. GOODWIN T.W. et GRIFFITHS L.A. (1952). Studies in carotenogenesis. V. Carotene production by various mutants of Phycomyces blakesleeianus and by Phycomyces nitens. Bioch. J., 52, 499-501.
66. GOTTLIEB D. et GILLIGAN G.M. (1946). Vitamins in fungi. Arch. Biochem., 10, 163 (cité in 60).
67. GRIBANOVSKI-SASSU O. et FOPPEN F.H. (1967). The carotenoids of the Fungus Epicoccum nigrum Link. Phytochem., 6, 907-909.
68. GROB E.C. et BOSCHETTI A. (1962). Über das natürlich Vorkommen von Lycopenen in Neurospora crassa. Chimia, 16, 15.

69. GROB E.C. et BUTLER R. (1954). Über die biosynthese des β -carotins bei Mucor hiemalis Wehmer. Experientia., 10, 250-251.
70. HANNA C. et BULAT T.J. (1953). Pigment study of Dacrymyces ellisii. Mycologia, 45, 143.
71. HASEGAWA T. et BANNO I. (1961). Studies on the Genus Rhodotorula. IX. The distribution of carotenogenic species among the Asporogenous Yeasts. J. Ferment. Technol. Jap., 38, 173-176.
72. HASEGAWA T., BANNO I. et YAMAUCHI S. (1959). A taxonomic study on the genus Rhodotorula. I. The subgenus Rubrotorula nov. subg.. J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 200-212.
73. HASEGAWA T., BANNO I. et YAMAUCHI S. (1960). A taxonomic study on the genus Rhodotorula. II. The subgenus Flavotorula nov. subg.. J. Gen. Appl. Microbiol., 6, 196-215.
74. HAXO F. (1949). Studies on the carotenoid pigments of Neurospora. I. Composition of the pigment. Arch. Bioch., 20, 400-421.
75. HAXO F. (1950). Carotenoids of the mushroom Cantharellus cinnabarinus. Bot. Gaz., 112, 228-232.
76. HAXO F. (1955). Some biological aspects of fungal carotenoids. Fortsch. Chem. Org. Naturst., 12, 169-197.
77. HEGNAUER R. (1962). Chemotaxonomie der Pflanzen, 1. Birkhäuser Verlag, Bâle.
78. HEIM P. (1946). Sur la localisation des pigments carotiniens chez les Phalloïdées. C.R. Acad. Sc. Paris, 222, 1354-1355.
79. HEIM P. (1946). Sur les pigments carotiniens des Champignons. C.R. Acad. Sc. Paris, 223, 1170-1172.
80. HEIM P. (1947). Etudes sur la localisation des pigments carotiniens chez les Champignons. Rev. Mycol., 12, 104-125.
81. HEIM P. (1948). Sur le chondriome des Phalloïdées. C.R. Acad. Sc. Paris, 226, 266.
82. HEIM P. (1949). Nouvelles observations sur la localisation des caroténoïdes chez les Champignons. Le Botaniste, 34, 231-241.
83. HEIM R. (1942). Les pigments des champignons dans leurs rapports avec la Systématique. Bull. Soc. Chim. Biol. Fr., 29, 48-79.
84. HEIM R. (1949). Une Clavaire cantharelloïde australienne à pigment carotinién cristallisé. Rev. Mycol., 14, 113-120.
85. HERTZBERG G.S. et LIAAEN JENSEN S. (1967). The carotenoids of blue-green Algae. III. A comparative study of mutatochrome and flavacin. Phytochem., 6, 1119-1126.
86. HOUGEN F., CRAIG B. et LEDINGHAM G. (1958). The oil of wheat stem rust uredospores. Can. J. Microbiol., 4, 521-529.
87. ISLER O., LINDLAR H., MONTAVON M., RUEGG R. et ZELLER P. (1956). 52. Synthesen in der Carotenoid Reihe. 4. Mitteilung. Synthese von Isozeaxanthin. Helv. Chim. Acta, 39, 449-454.
88. ISLER O., MONTAVON M., RUEGG R. et ZELLER P. (1956). 53. Synthesen in der Carotenoid Reihe. 5. Mitteilung. Anwendungen der Reaktion von Whiting. Helv. Chim. Acta, 39, 454-462.

89. ISLER O., RUEGG R. et SCHWEITER U. (1967). Carotenoids as food colorants. Pure Appl. Chemistry, 14, 245-263.
90. ISLER O. et SCHUDEL P. (1963). Synthese und markierung von carotinen und carotinoiden, in LANG K., Carotine und Carotinoide, D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, p. 54-103.
91. JAYKO L.L., BAKER T.I., STUBBLEFIELD R.D. et ANDERSON R.F. (1962). Nutrition and metabolic products of Lactarius species. Can. J. Microbiol., 8, 361-371.
92. JENSEN A. (1963). Paper Chromatography of Carotene and Carotenoids in LANG K., Carotine und Carotinoids, D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, p. 119-127.
93. JENSEN A. et LIAAEN JENSEN S. (1959). Quantitative Paper Chromatography of Carotenoids. Acta Chem. Scand., 13, 1863-1868.
94. KARRER P. et JUCKER E. (1950). Carotenoids. Elsevier, New-York.
95. KOHL F.G. (1902). Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Beteundung in der Pflanze. Bornträger, Liepzig.
96. KRINSKY N.I. (1963). A Relationship between Partition coefficients of carotenoids and their Functional Groups. Anal. Biochem., 6, 293-302.
97. KUHNER R. (1928). Omphalia chrysophylla Fr.. Bull. Soc. Mycol., 44, Pl. XXVIII.
98. KUHNER R. (1934). Observations sur la localisation cytologique des substances colorées chez les Agarics et les Bolets. Le Botaniste, 26, 347-369.
99. KUHNER R. et ROMAGNESI H. (1953). Flore analytique des Champignons supérieurs. Masson, Paris.
100. LEBRETON Ph. (1962). Contribution à l'étude des flavonoïdes chez Humulus lupulus L. et autres Urticales. Thèse, Lyon, 94 p.
101. LEDERER E. (1938). Sur les caroténoïdes des Cryptogames. Bull. Soc. Chim. Fr., 20, 611-634.
102. LEDERER E. et LEDERER M. (1953). Chromatography. A review of principles and applications. Elsevier, New-York.
103. LIAAEN JENSEN S. (1962). Kgl. Norske Videnskab. Selskals Skrifter, 8.
104. LIAAEN JENSEN S. (1963). Bacterial carotenoids. X. On the constitution of the minor carotenoids of Rhodopseudomonas. 1. P 518. Acta Chem. Scand., 17, 303-312.
105. LIAAEN JENSEN S. (1963). Bacterial carotenoids. XI. On the constitution of the minor carotenoids of Rhodopseudomonas. 2. OH-R. Acta Chem. Scand., 17, 489-499.
106. LIAAEN JENSEN S. (1963). Bacterial carotenoids. XII. On the constitution of the minor carotenoids of Rhodopseudomonas. 3. OH-Y. Acta Chem. Scand., 17, 500-508.
107. LIAAEN JENSEN S. (1965). On fungal carotenoids and the natural distribution of spirilloxanthin. Phytochem., 4, 925-931.

108. LIAAEN JENSEN S. (1965). Biosynthesis and Function of carotenoids in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 19, 163-182.
109. LIAAEN JENSEN S. (1967). Recent advances in the chemistry of natural carotenoids. Pure Appl. Chemistry, 14, 227-244.
110. LIAAEN JENSEN S., HEGGE E. et JACKMANN L.M. (1964). Bacterial carotenoids. XVII. The carotenoids of Phytosynthetic Green Bacteria. Acta Chem. Scand., 18, 1703-1718.
111. LIAAEN JENSEN S. et JENSEN A. (1965). Recent progress in carotenoid Chemistry. Progress Chem. Fats Lipids, 8, 129-212.
112. LODDER J. et KREGER-VAN RIG N.J.W. (1952). The Yeasts, a taxonomic study. Interscience, New-York.
113. LODDER J., SLOOF W.C. et KREGER-VAN RIJ N.J.W. (1958). Classification of Yeasts, in COOK A.H., The Chemistry and Biology of Yeasts, Academic Press, New-York, p. 1-62.
114. Mc CORMICK A. et LIAAEN JENSEN S. (1966). Silylation as a method for establishment of tertiary hydroxyl groups in carotenoids. Acta Chem. Scand., 20, 1989-1991.
115. MARKHAM M.C. et LIAAEN JENSEN S. (1968). Carotenoids of Higher Plants. I. The structures of lycopanthin and lycophyll. Phytochem., 7, 839-844.
116. MASE Y. (1957). "Etudes sur la biosynthèse des caroténoïdes". Vitamins, Jap., 13, 402-412 (en japonais ; B.S. 19 136 166).
117. MASE Y. (1958). "Etudes sur la biosynthèse des caroténoïdes". Vitamins, Jap., 14, 104-114 et 161-210 (en japonais ; B.S. 20 237 167).
118. MASE Y., RABOURN W.J. et QUACKENBUSH F.W. (1957). Carotene production by Penicillium sclerotiorum. Arch. Biochem. Biophys., 68, 150-156.
119. MRAK E.M., PHAFF H.J. et MACKINNEY G. (1949). A simple test for carotenoid pigment in Yeast. J. Bact. USA, 57, 409-411.
120. NAKAYAMA T., MACKINNEY G. et PHAFF H.J. (1954). Carotenoids in Asporogenous Yeasts. J. Microbiol. Serol., 20, 217-228.
121. NUSBAUM-CASSUTO E. et VILLOUTREIX J. (1965). Mise en évidence du lycopersène chez les végétaux supérieurs. C.R. Acad. Sc. Paris, 260, 1013-1015.
122. OLCOVITCH et MATTIL (1930). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 28, 240 (cité in 123).
123. PASTAC I.A. (1942). Les matières colorantes des Champignons. Rev. Mycol., H.S. 2, 88 p.
124. PETERSEN R.H. (1967). Notes on Clavarioid Fungi. VI. Two new species and Notes on the origin of Clavulina. Mycologia, 49, 39-46.

125. PETERSEN R.H. (1967). Evidence of Interrelationships of the Families of Clavarioid fungi. Trans. Br. mycol. Soc., 50 641-648.
126. PETERSON W.J., EVANS W.R., LECCE E., BELL T.A. et ETCHELLS (1958). Quantitative determination of carotenoids in Yeasts of the genus Rhodotorula. J. Bact. USA, 75, 586-591.
127. PETRACEK F.J. et ZECHMEISTER L. (1956). Determination of Partition coefficients of Carotenoids as a Tool in Pigment Analysis. Anal. Biochem., 28, 1484-1485.
128. PRAUS R. et DYR J. (1958). Biosynthese der Carotinoide in der Hefe Rhodotorula gracilis. V. Farblose Polyene. Collect. czechosl. chem. communic., 23, 1987-1990.
129. RANDERATH K. (1964). Chromatographie sur couches minces. Gauthier Villars, Paris.
130. RAU W. et ZEHENDER C. (1959). Die Carotinoids von Fusarium aquaeductum Logh.. Arch. Mikrobiol., 32, 423-428.
131. RUTTER L. (1948). A modified Technique in Filter-Paper Chromatography. Nature, 161, 435-436.
132. SCHNEIDER J.C. (1964). Die Farbstoff der Fruchtkoeper von Sphaerobolus stellatus (Thode) Pers. Planta, 63, 351-355.
133. SCOTT A.I. (1964). Interpretation of the Ultra-violet Spectra of Natural Products. Pergamon Press, Londres.
134. SIMPSON K.L. et GOODWIN T.W. (1965). A comparaison of synthetic β -zeacarotene and samples obtained from Rhodotorula glutinis and yellow corn. Phytochem., 4, 193-195.
135. SIMPSON K.L., NAKAYAMA T.O.M. et CHICHESTER C.O. (1964). The biosynthetic origin of the carboxyl oxygen atoms of the carotenoid pigment, torutarhodin. Biochem. J. G.B., 92, 508-510.
136. SIMPSON K.L., NAKAYAMA T.O.M. et CHICHESTER C.O. (1964). Biosynthesis of Yeast carotenoids. J. Bacteriol. USA, 88, 1688-1694.
137. SINGER R. (1962). The Agaricales in Modern Taxonomy. J. Cramer, Vienne.
138. SMITS B.L. et PETERSON (1942). Carotenoids of telial galls of Gymnosporangium juniperi-virginianae. Science, 96, 210-211.
139. STAHL E., BOLLIGER H.R. et LEHNERT L. (1963). Dünnschicht-Chromatographie von Carotin- und Carotinoidgemischen, in LANG K., Carotin und Carotinoide, D. Steinkoff Verlag, Darmstadt, p. 129-134.
140. SUBBARAYAN C., JUNGALWALA F.B. et CAMA H.R. (1965). Applicability of Partition Ratios, Mercuric Chloride Complexes, and Chromatographic Behaviour for the Identification of Carotenoids. Anal. Biochem., 12, 275-281.
141. SURMATIS J.D. et OFNER A. (1963). Total synthesis of spirilloxanthin, dehydrolycopene and 1-1' dihydroxy 1, 2, 1', 2' - tetrahydrolycopene. J. Org. Chem., 28, 2735-2739.

142. TANG Y.W., BONNER J. et ZECHMEISTER L. (1949). Some further experiments on red Yeasts Polyenes. Arch. Biochem. USA, 21, 455-456.
143. TCHANG J.L. (1938). La nature et la synthèse biochimique des pigments caroténoïdes contenus dans les levures rouges. Thèse, Lyon, 70 p.
144. THOMMEN H. et WACKERNAGEL H. (1963). Isolierung und Nachweis von Canthaxanthin in kleinen Flamingo. Biochim. Biophys. Acta, 69, 387-396.
145. TSUCHIYA T., FUKAZAWA Y. et KAWAKITA S. (1965). Significance of serological studies on Yeasts. Mycopath. Mycol. Appl., 26, 1-15.
146. TURIAN G. (1955). Identification du lycopène dans le réceptacle fructifère du Gastéromycète Anthurus aseriformis Mc Alp.. C.R. Acad. Sc. Paris, 241, 764-765.
147. TURIAN G. (1960). Identification des caroténoïdes majeurs de quelques Champignons Ascomycètes et Basidiomycètes. Neurosporene chez Cantharellus infundibuliformis. Arch. Mikrobiol., 36, 139-146.
148. TURIAN G. et CANTINO E. (1959). Identification du γ -carotène dans les sporanges de résistance du Champignon Allomyces macrogynus. C.R. Acad. Sc. Paris, 294, 1788-1789.
149. TURIAN G. et HAXO F. (1954). Minor polyene components in the sexual phase of Allomyces javanicus. Bot. Gaz., 54, 254-260.
150. VALADON L.R.G. (1963). Carotenoids pigments of Protomyces inundatus Dangeard. Phytochem., 2, 71-73.
151. VALADON L.R.G. (1964). Rubixanthin in Peziza (Aleuria) aurantia. Biochem. J., 92, 19-20.
152. VALADON L.R.G. (1964). Carotenoids pigments of some Lower Ascomycetes. J. Exp. Bot., 15, 219-224.
153. VALADON L.R.G. (1966). Carotenoids of Fungi. Adv. Front. Plant. Sc., 15, 183-205.
154. VALADON L.R.G. et COOKE R.C. (1963). Carotenoid pigments of the Nematode-Trapping Hyphomycete Arthrobotrys oligospora. Phytochem., 2, 103-105.
155. VALADON L.R.G. et HEALE J.B. (1964). Carotenoids pigments on a mutant strain of Verticillium albo-atrum Reinke and Berthold. Nature, 202, 512.
156. VALADON L.R.G. et HEALE J.B. (1965). Carotenoids in mutants of Verticillium albo-atrum. J. Gen. Microbiol., 41, 341-348.
157. VALADON L.R.G. et MUMMERY R.S. (1966). Inhibition of carotenoid Synthesis in a Mutant of Verticillium albo-atrum. J. Gen. Microbiol., 45, 531-540.
158. VILLOUTREIX J. (1960). Sur les caroténoïdes d'une Levure rouge : Rhodotorula mucilaginosa (Jörg.) Harrison. Thèse, Nancy, 70 p.

159. WEEDON B.C.L. (1965). Chemistry of the Carotenoids, in GOODWIN T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, Londres, p. 75-125.
160. WICKERHAM L.J. et BURTON K.A. (1948). Carbon assimilation tests for the classification of Yeasts. J. Bacteriol. USA, 56, 363-371.
161. WILLIAMS R.J.H., DAVIES B.H. et GOODWIN T.W. (1965). The presence of β -zeacarotene in cultures of diphenylamine inhibited Phycomyces blakesleeana. Phytochem., 4, 759-760.
162. WILLSTAEDT H. (1937). Über die Carotinoide einiger Cantharellus. Svensk. Kem. Tids., 49, 318-323.
163. WISSELINGH C. van (1914). Flora, 107, 371 (cité in 94).
164. YAMAZAKI I., GOOSHI M. et YAMAGUCHI M. (1958). Studies on Sporobolomyces red yeast. XII. Separation of carotenoid pigments. J. Agric. Chem. Soc. Jap., 32, 363-366.
165. ZAJIC J.E. et KUEHN H.H. (1962). Yellow pigments by Aspergillus niger. Mycopath. Myc. Appl., 17, 149-158.
166. ZECHMEISTER L. (1962). Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Aryl polyenes. Springer Verlag, Vienne.
167. ZOPF W. (1890). Die Pilze. Trewendt, Breslau.
168. ZURZYCKA A. (1963). Aspergillus giganteus Wehm mut. alba Zurz.. Acta Soc. Bot. Pol., 32, 715-718.

Vu :
Les Membres du Jury,

MM. KÜHNER
BOIDIN
LEBRETON.

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. BRACONNIER.

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 4 juillet 1968

Le Recteur,

P. LOUIS.

